

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLAYTON FERNANDES DE SOUZA

**GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*:
ESTRUTURA, MODIFICAÇÃO QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DE
PROPRIEDADES**

**CURITIBA
MARÇO, 2009**

CLAYTON FERNANDES DE SOUZA

**GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*:
ESTRUTURA, MODIFICAÇÃO QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DE
PROPRIEDADES**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química, Curso de Mestrado em Química Orgânica, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Rita Sierakowski – UFPR.

**CURITIBA
2009**

TERMO DE APROVAÇÃO

**GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *CAESALPINIA FERREA* VAR. *FERREA*:
ESTRUTURA, MODIFICAÇÃO QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DE PROPRIEDADES**

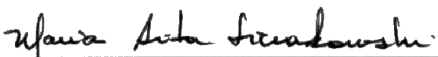
por

CLAYTON FERNANDES DE SOUZA

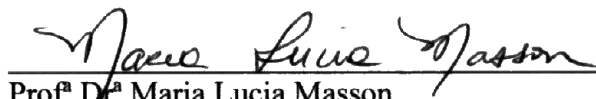
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

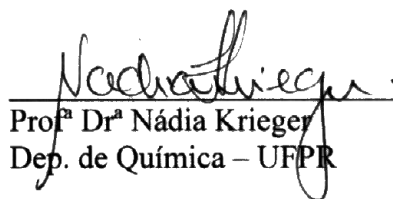
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador: 

Prof^a Dr^a Maria Rita Sierakowski
Dep. de Química – UFPR



Prof^a Dr^a Maria Lucia Masson
Dep. de Eng. Química - UFPR



Prof^a Dr^a Nádia Krieger
Dep. de Química – UFPR

*A minha Família por acreditar e me
orientar para chegar aonde cheguei.*

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Dr.^a Maria Rita Sierakowski, por me mostrar que tudo na vida precisa de esforço, superação, humildade e esperança, mostrando o quanto é importante manter a simplicidade de espírito e acreditando no meu trabalho desde a iniciação científica até o mestrado, contribuindo imensamente na minha vida pessoal e profissional.

A Dr.^a Neoli Lucyszyn, por ser companheira, amiga e contribuir grandemente na realização desse trabalho.

A Dr.^a Lucy Ono, uma pessoa de grande simpatia e coração, batalhadora e amiga, pelos ótimos encontros e bate-papos.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Biopolímeros, ou “Família Biopol”, que, dentre os vários que fizeram parte dele, sempre deixaram muitas coisas positivas.

As meninas do Biopolímeros, Francine, Cristiane e Tatiane, que hoje fazem parte de pessoas que estão profundamente no meu coração, como irmãs e companheiras que contribuíram em diversas discussões, no desenvolvimento e conclusão desse mestrado.

Aos alunos de iniciação científica, Iris e Leandro, e ao Mestre Fernando pela contribuição direta e indireta no meu trabalho e pelas boas conversas.

Aos novos membros do Biopolímeros, o casal Dr. Cesar Tischer e Dr.^a Paula Tischer, pelos auxílios e boas conversas em momentos de descontração.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, Dr. Miguel D. Nosedá e Dr. Guilherme L. Sassaki, que sempre me auxiliaram em diversos momentos de necessidade de apoio do departamento, especialmente, permitindo a realização de grande parte das análises por ressonância magnética nuclear e cromatografia em fase gasosa, que possibilitaram o andamento e a conclusão deste trabalho.

Ao LAMIR/UFPR pelo auxílio e realização das análises térmicas.

Aos professores e funcionários do departamento de Química que contribuíram no desenvolvimento do meu mestrado e, em inúmeras vezes, que me

orientaram em diversas situações. Agreço, especialmente, a Prof.^a Dr.^a Iara Messerschmidt pelos ensinamentos em espectroscopia de Infravermelho.

A todos os colegas do departamento de Química que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento da minha pesquisa, principalmente, aos meus amigos Alexandre, Silvio, Tiago, Alesandro e Leandro entre outros, que me acompanharam desde a graduação, pelos encontros alegres e descontraídos durante todo esse tempo.

A Cristiana Tabuti Aoki, minha companheira, que sempre foi meu porto seguro nos momentos de dificuldade, me dando forças para continuar a trilhar o caminho escolhido e por acreditar no meu potencial, meu sincero muito obrigado.

Ao CNPq pela bolsa DTI e suporte financeiro; a CAPES e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

"A natureza é o único livro que oferece um conteúdo valioso em todas as suas folhas."

(Johann Goethe)

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva, infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

(Albert Einstein)

"Em todas as coisas humanas, quando se examinam de perto, demonstra-se que não se podem afastar os obstáculos sem que deles surjam outros."

(Nicolau Maquiavel)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo extrair e caracterizar o biopolímero (GMPF) extraído das sementes da espécie *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*, conhecida popularmente como Pau-ferro. As cromatografias em fase gasosa (GC) e em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS) mostraram que o polissacarídeo é constituído por uma cadeia principal de 1→4-β-D-manopirranose (Man), substituída em O-6 por unidades de α-D-galactopirranose (Gal), com razão Man/Gal de 2,1 sendo, portanto, uma galactomanana (GM). As análises por RMN do hidrogênio (¹H-RMN) e carbono (¹³C-RMN) confirmaram essa relação entre os monossacarídeos e, uma distribuição irregular das cadeias laterais, ao longo da cadeia principal. Duas modificações químicas via oxidação foram realizadas em condições alcalinas sobre a GM, gerando um derivado carboxilado (GMPFOXT) e um aminoalquilado/carboxilado (GMPFOXD), utilizando o reagente N-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidina (TEMPO) e a dodecilamina para o processo de N-alquilação/oxidação. Através do espectro de FTIR, bandas características da conversão das hidroxilas em carboxilas, em 1730 cm⁻¹, foram observadas nos dois derivados. E, na GMPFOXD, duas bandas foram atribuídas a N-alquilação, uma em 1650 e a outra em 1620 cm⁻¹, relacionadas aos estiramentos das ligações C-N e N-H, respectivamente. A evidência da obtenção dos derivados por ¹³C-RMN foi através dos sinais em δ 175,3 referente à carbonila do ácido e em δ 53,5 atribuído à ligação C-N de uma amina secundária. Por cromatografia de permeação em gel (GPC) acoplada aos detectores viscosimétrico, RI e de espalhamento (LALLS e RALLS) as amostras apresentaram polidispersão entre 1,4 – 2,2, ou seja, com cadeias de vários tamanhos, conformação ao acaso e R_g de 79,3 nm para a GMPF e de 52,10 e 32,8 nm, respectivamente, para GMPFOXT e GMPFOXD. Os derivados GMPFOXT e GMPFOXD apresentaram diminuição de massa molar (M_w = 224,5x10⁵ e 236,3x10⁵ g/mol, respectivamente) em relação à GMPF (M_w = 8,71x10⁵ g/mol), atribuída a uma possível β-eliminação, ou a diferentes estados de agregação. Através das medidas de emissão de fluorescência do pireno incorporado em soluções contendo as GMs foram determinadas as concentrações de agregação crítica (CAC) de 0,3 mg/mL para GMPF, e 0,78 e 0,69 mg/mL para GMPFOXT e GMPFOXD, respectivamente. O aumento nos valores da CAC para os derivados foram justificados pela possível diminuição de tamanho das cadeias por β-eliminação, assim como pela presença das cargas geradas pela modificação química. Os resultados obtidos em termos de composição, estrutura e propriedades podem servir para potencializar e viabilizar a utilização da GM extraída das sementes do Pau-ferro como uma nova fonte dessa goma.

Palavras-chave: galactomanana, goma, Pau-ferro, *Caesalpinia ferrea*, oxidação, N-alquilação, concentração de agregação crítica.

ABSTRACT

The aim of the present work was to extract and characterize the biopolymer (GMPF) from *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds, popularly known as “Pau-ferro”. The composition analyses by means of gas phase chromatography (GC) and GC coupled to mass spectrometer (GC-MS) showed a β -(1 \rightarrow 4)-D-manopyranose (Man) main chain, substituted at O-6 by for α -(1 \rightarrow 6)-D-galactopyranose (Gal) units, whose Man/Gal ratio of 2.1 characterized a galactomannan. The hydrogen (^1H) and carbon (^{13}C) NMR analyses confirmed the monosaccharides relationship and a non-regular distribution of the Gal units along the main chain. Two chemical modifications on GMPF, using the N-oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine reagent (TEMPO) and the dodecylamine, were accomplished to oxidation in alkaline conditions and to N-alkylation/oxidation, respectively, generating a carboxylate (GMPFOXT) and an aminoalkylate/carboxylate (GMPFOXD) derivative,. By means of FTIR spectra, bands of the conversion of the hydroxyl to carboxyl groups in 1730 cm^{-1} , were observed to GMPFOXT and GMPFOXD. In GMPFOXD two bands were attributed to N-alkylation, one in 1650 and another in 1620 cm^{-1} , related to the stretching of C-N and N-H linkage, respectively. The evidence of the modification process was also seen by ^{13}C -RMN, through the signals at δ 175.3 ppm regarding the carbonyl of the acidic group and at δ 53.5 ppm to C-N connection corresponding to a secondary amine. The samples, in solution, were analysed by gel permeation chromatography (GPC) and presented polydisperse behaviour, around 1.4 – 2.2, indicating several size variations on the polymeric chains. The GMPFOXT and GMPFOXD presented a decreasing on the molar mass ($M_w = 224.5 \times 10^5$ and 236.3×10^5 g/mol, respectively) comparatively to GMPF ($M_w = 8.71 \times 10^5$ g/mol), which could be attributed to a possible β -elimination or different aggregation states. By fluorescence measurements, using pyrene as fluorescent probe into polymeric solutions, were feasible to determine the critical aggregation concentration (CAC) as 0.3 mg/mL to GMPF, and 0.78 and 0.69 mg/mL to GMPFOXT and GMPOXD, respectively. To de derivatives, the values are agree with a possible decreasing on polymer chain size by β -elimination, as well as by the presence of charges incorporated during the chemical modifications. The results of polymer composition, structure and properties can potentiate and make the use of GM from “Pau-ferro” possible as a new source of this gum.

Keywords: galactomannans, gum, Pau-ferro, *Caesalpinia ferrea*, oxidation, N-alkylation, critical aggregation concentration

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	MECANISMO DE FORMAÇÃO DA ESTRUTURA CÍCLICA DO MONOSSACARÍDEO ATRAVÉS DE UMA HEXOSE D-GLUCOPIRANOSE (A) E UMA PENTOSE D-FRUTOFURANOSE (B) _____	24
FIGURA 2 –	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA REGIÃO DO ENDOSPERMA DA SEMENTE DE UMA LEGUMINOSA (<i>Sesbania marginata</i>) _____	26
FIGURA 3 –	ESTRUTURA PARCIAL DA GALACTOMANANA E SUAS RESPECTIVAS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS _____	26
FIGURA 4 –	ROTA BIOSSINTÉTICA ENVOLVENDO O CATABOLISMO DA GALACTOMANANA E SEUS PRODUTOS GERADOS NO EMBRIÃO DA SEMENTE DE UMA LEGUMINOSA _____	28
FIGURA 5 –	COMPOSIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS DAS GALACTOMANANAS UTILIZADAS COMERCIALMENTE _____	29
FIGURA 6 –	DADOS REFERENTES À EXPORTAÇÃO E IMPORTAÇÃO DAS PRINCIPAIS GALACTOMANANAS COMERCIAIS (GOMA GUAR E LOCUSTA). PRODUÇÃO E CONSUMO NO PERÍODO DE 01/1996 A 12/2008 _____	30
FIGURA 7 –	REAÇÃO DE OXIDAÇÃO UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO (N-OXIL-2,2,6,6-TETRAMETILPIPERIDINA) NA CONVERSÃO DO ÁLCOOL A ALDEÍDO _____	34
FIGURA 8 –	MECANISMO PROPOSTO PARA CONVERSÃO DO ÁLCOOL PRIMÁRIO DA α -D-GALACTOPIRANOSE A ALDEÍDO E DEPOIS A ÁCIDO UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO, EM SISTEMA NaOCl/NaBr _____	35
FIGURA 9 –	MECANISMO PROPOSTO PARA A SÍNTESE DO POLISSACARÍDEO AMINOALQUILADO (GMPFOX) PELA REAÇÃO COM O REAGENTE TEMPO, NaOCl EM MEIO ALCALINO E A REDUÇÃO COM O ÍON CIANOBOROHIDRETO _____	36
FIGURA 10 –	ASPECTO MORFOLÓGICO DA <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> ; ÁRVORE (A); FLORES E FOLHAS (B); VAGEM (C); SEMENTES (D); TRONCO VISÃO EXTERNA (E); TRONCO VISÃO INTERNA (F) _____	38

FIGURA 11 –	MECANISMO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DE GLÍCOSÍDEOS. ETAPAS: (1)→(2): PROTONAÇÃO DO OXIGÊNIO GLICOSÍDICO; (3) FORMAÇÃO DO ÍON CÍCLICO CARBONO-OXÔNIO (<i>HALF CHAIR</i>); (4) FORMAÇÃO DO AÇUCAR REDUTOR PROTONADO; (5) LIBERAÇÃO DO PRÓTON GERANDO AÇUCAR REDUTOR _____	40
FIGURA 12 –	ESQUEMA GERAL DE UM CROMATÓGRAFO EM FASE GASOSA (GC HEWLETT PACKARD 5890 – A série II) _____	41
FIGURA 13 –	RESULTADO DE UMA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS; O ESPECTRO DE MASSA CORRESPONDE A CADA PICO GERADO EM GC _____	42
FIGURA 14 –	ESQUEMA DO PROCESSO DE METILAÇÃO PROPOSTO POR CIUCANU, 2006. (1) FORMAÇÃO DO ALCÓXIDO, (2) METILAÇÃO POR IODETO DE METILA, (3) (4) PROCESSO DE METILAÇÃO NAS HIDRÓXILAS SECUNDÁRIAS, (5) FORMAÇÃO DA BASE CONJUGADA (I ⁻) EM MEIO ALCALINO _____	44
FIGURA 15 –	ETAPAS DO PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO POR METILAÇÃO PELO MÉTODO DE CIUCANU E KEREK (1984). OS VALORES ENTRE AS LINHAS PONTILHADAS INDICAM POSSÍVEIS FRAGMENTAÇÕES NO ESPECTRO DE MASSAS _____	45
FIGURA 16 –	PRINCÍPIO DE OPERAÇÃO DE UMA COLUNA DE GPC POR EXCLUSÃO DE TAMANHO (SEC – <i>SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY</i>) _____	46
FIGURA 17 –	ASPECTO DAS VIBRAÇÕES DA MOLÉCULA OBSERVADAS EM ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE INFRAVERMELHO (IR) _____	50
FIGURA 18 –	ESPECTRO DE EMISSÃO GERADO PELO RETORNO DO ELÉTRON DO SEU ESTADO EXCITADO, OBTIDO POR ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA _____	52
FIGURA 19 –	EFEITO DA ADIÇÃO DO POLÍMERO EM RELAÇÃO AO SOLVENTE NA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO, VARIAÇÃO DO PICO (I), AMBIENTE MENOS HIDROFÓBICO E PICO (III) AMBIENTE MAIS HIDROFÓBICO _____	53
FIGURA 20 –	PROCEDIMENTO VIA EXTRAÇÃO AQUOSA DO POLISSACARÍDEO DAS SEMENTES DA <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> _____	57
FIGURA 21 –	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> _____	68

FIGURA 22 –	CROMATOGRAMA RESULTANTE DA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (GC) EM COLUNA DB-225, À 220°C, DOS ACETATOS DE ALDITÓIS DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DAS SEMENTES DE <i>C. ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (AMOSTRA GMPFP)	70
FIGURA 23 –	CONSUMO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH (0,05 mol/L) DURANTE A OXIDAÇÃO DA GALACTOMANANA DE <i>C. ferrea</i> var. <i>ferrea</i> PELA REAÇÃO COM O REAGENTE TEMPO (2,2,6,6,-TETRAMETILPIPERIDINA-1-OXIL); O PERFIL DA CURVA INDICA A CONVERSÃO DO ÁLCOOL A ÁCIDO CARBOXÍLICO	74
FIGURA 24 –	CONSUMO DE NaOH (0,05 mol/L) DURANTE A N-ALQUILAÇÃO/OXIDAÇÃO DA GALACTOMANANA DE <i>C. ferrea</i> var. <i>ferrea</i> PELA REAÇÃO COM REAGENTE TEMPO (2,2,6,6,-TETRAMETILPIPERIDINA-1-OXIL), O PERFIL DA CURVA INDICA A CONVERSÃO DO ÁLCOOL A ALDEÍDO E ESSE A N-ALQUIL OU A ÁCIDO CARBOXÍLICO GERANDO O DERIVADO FINAL GMPFOXD	75
FIGURA 25 –	SEMI-REAÇÕES E REAÇÃO GLOBAL PARA A CONVERSÃO DAS HIDROXILAS PRIMÁRIAS DO POLISSACARÍDEO A ÁCIDO PELA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO COM O REAGENTE TEMPO	76
FIGURA 26 –	SÍNTESE E ESTRUTURAS DOS DERIVADOS GERADOS POR MODIFICAÇÃO ESPECÍFICA DA GMPF COM O REAGENTE TEMPO	76
FIGURA 27 –	ESPECTRO DE RMN DO HIDROGÊNIO (¹ H) DA GALACTOMANANA DE <i>C. ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (AMOSTRA GMPFP) E INTEGRAÇÃO NA REGIÃO ANOMÉRICA DO POLISSACARÍDEO PARA OBTENÇÃO DA RELAÇÃO MAN/GAL, SENDO (A) α-D-GALACTOPIRANOSE E (B) β-D-MANOPIRANOSE. ANÁLISE EM 400 MHz DE FREQUÊNCIA, EM D ₂ O, A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ)	78
FIGURA 28 –	ESPECTRO DE RMN DO CARBONO TREZE (¹³ C) COM AS ATRIBUIÇÕES PARA OS CARBONOS DAS UNIDADES DE β-D-MANOPIRANOSE (MAN) E α-D-GALACTOPIRANOSE (GAL) DA GALACTOMANANA DE <i>C. ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (AMOSTRA GMPFP). ANÁLISE EM 100 MHz DE FREQUÊNCIA, EM D ₂ O, A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ)	79

- FIGURA 29 –** DECONVOLUÇÃO E GERAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN (B) DO CARBONO TREZE (^{13}C) NA REGIÃO DO CARBONO ANOMÉRICO (β -D-MANOPIRANOSE – MAN1 E α -D-GALACTOPIRANOSE – GAL1) DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea* (AMOSTRA GMPFP) EM SOFTWARE MESTREC. A INTEGRAÇÃO FORNECEU A RELAÇÃO MAN/GAL (2,1:1) DO POLISSACARÍDEO. ANÁLISE EM 100 MHz DE FREQUÊNCIA, EM D_2O , A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ) _____ 80
- FIGURA 30 –** DECONVOLUÇÃO (A) E GERAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DO CARBONO TREZE (^{13}C) NA REGIÃO DO C-4 DA CADEIA DA β -D-MANOPIRANOSE (B) DA AMOSTRA GMPFP. OS SÍMBOLOS EM ROMANO INDICAM O GRUPO DE DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM DEA E MORRISON (1975). ANÁLISE EM 100 MHz DE FREQUÊNCIA, EM D_2O , A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ) _____ 81
- FIGURA 31 –** ESQUEMA ESTRUTURAL DA DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES DE α -D-GALACTOPIRANOSE NA CADEIA DE β -D-MANOPIRANOSE PRESENTE NA GMPF OBTIDO PELA INTEGRAÇÃO DA REGIÃO DO C-4 NO ESPECTRO DE RESULTANTE DA DECONVOLUÇÃO DO ^{13}C -RMN _____ 82
- FIGURA 32 –** ESPECTRO BIDIMENSIONAL HMQC (C–H) RESOLVIDO PARA A GALACTOMANANA DA *C. ferrea* var. *ferrea* (GMPFP). EM D_2O , A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ). * = MAN5* E MAN6* DAS UNIDADES SUBSTITUÍDAS _____ 83
- FIGURA 33 –** ESPECTRO BIDIMENSIONAL DA CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR DO HIDROGÊNIO (COSY) DA GALACTOMANANA DA *C. ferrea* var. *ferrea* (amostra GMPFP); GAL – PARA OS HIDROGÊNIOS DA α -D-GALACTOPIRANOSE E MAN – PARA OS HIDROGÊNIOS DA β -D-MANOPIRANOSE, EM D_2O , A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ) _____ 84
- FIGURA 34 –** ^{13}C -RMN DA GALACTOMANANA DE *C.ferrea* var. *ferrea* BRUTA (GMPF, A), DO DERIVADO OXIDADO (GMPFOXT, B) E SINAL DA CARBONILA GERADA NA SÍNTESE COM REAGENTE TEMPO (C) EM SISTEMA $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ À 30°C, UTILIZANDO ACETONA COMO PADRÃO INTERNO, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM ppm (δ) _____ 85
- FIGURA 35 –** ^{13}C -RMN DO DERIVADO N-ALQUILADO/OXIDADO DA GALACTOMANANA *C.ferrea* var. *ferrea* (GMPFOXD) EM SISTEMA $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ À 30°C, UTILIZANDO ACETONA COMO PADRÃO INTERNO, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM ppm (δ). AS UNIDADES EM AZUL INDICAM A QUAL CARBONO É ATRIBUÍDO O SINAL _____ 86

- FIGURA 36 –** ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO ($2600-4000\text{ cm}^{-1}$) DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea* (GMPF) E DE SEUS DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD). (u.a.) = UNIDADE ARBITRÁRIA _____ 88
- FIGURA 37 –** ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO ($700-1850\text{ cm}^{-1}$) DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea* (GMPF) E DE SEUS DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD). (u.a.) = UNIDADE ARBITRÁRIA _____ 89
- FIGURA 38 –** PERFIL DE ELUIÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE PERMEÇÃO EM GEL (GPC) DAS GALACTOMANANAS DE GUAR (A), DE PAU-FERRO (B), E DERIVADOS OXIDADO (C) E N-ALQUILADO/OXIDADO (D) COM TRIDETECTORES: SENDO (RI) – ÍNDICE DE REFRAÇÃO, ESPALHAMENTO DE LUZ EM (RA) ÂNGULO RETO E (LA) – EM ÂNGULO BAIXO (7°) _____ 92
- FIGURA 39 –** GRÁFICO DA RELAÇÃO ENTRE OS PICOS III/I DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (mg/mL) _____ 96

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1 –	RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO EM PORCENTAGEM (m/m) EM TERMOS DE MASSA RESIDUAL, UMIDADE, PROTEÍNA E CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO BRUTA (GMPF) EXTRAÍDAS DE SEMENTES DA <i>C. ferrea</i> var. <i>ferrea</i> , E RENDIMENTOS EM RELAÇÃO A GOMA GUAR (GG)	66
TABELA 2 –	COMPOSIÇÕES MONOSSACARÍDICAS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (GC) DOS POLISSACARÍDEOS DE SEMENTES DE <i>C.ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (GMPFP) E DE GOMA GUAR (GG)	70
TABELA 3 –	ANÁLISE POR METILAÇÃO DA GALACTOMANANA DE <i>C.ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (GMPFP) NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS	72
TABELA 4 –	RENDIMENTO (% m/m) E GRAU DE CONVERSÃO (G.O., %) DOS DERIVADOS DA OXIDAÇÃO (GMPFOXT) E N-ALQUILAÇÃO/OXIDAÇÃO (GMPFOXD) DA GALACTOMANANA DE <i>C. ferrea</i> var. <i>ferrea</i>	77
TABELA 5 –	ATRIBUIÇÕES DOS PICOS DAS ANÁLISES DE RMN DO CARBONO (¹³ C-RMN) E HIDROGÊNIO (¹ H-RMN) DA GALACTOMANANA DA <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i>	82
TABELA 6 –	BANDAS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR) OBSERVADAS NOS ESPECTROS DA GALACTOMANANA DE <i>C. ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (GMPF) E SEUS DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD)	90
TABELA 7 –	VALORES DE MASSA MOLAR (M _w E M _n), POLIDISPERSÃO (M _w /M _n), RAO DE GIRO (R _g), RAO HIDRODINAMICO R _h , VISCOSIDADE INTRÍNSECA ([η]) E CONSTANTE α DE MARK-HOUWINK PARA AS AMOSTRAS DE GALACTOMANANA DE <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (GMPF), <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> (GG) E DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD)	93
TABELA 8 –	VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE AGREGAÇÃO CRÍTICA (CAC) DA GMPF, GG, DERIVADO OXIDADO (GMPFOXT) E DERIVADO N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD)	95
QUADRO 1 –	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA PLANTA <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i>	37
QUADRO 2 –	TIPOS DE LIGAÇÕES PRESENTES NAS ESTRUTURAS DA GALACTOMANANA DE <i>C. ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (GMPF) E DE SEUS DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GFMPOXD)	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Man	- Unidade monossacarídica de β -D-manopirranose
Gal	- Unidade monossacarídica de α -D-galactopirranose
SPS	- Sacarose Fosfatosintase
FRU-6-P	- Frutose-6-fosfato
UDP-GAL	- Galactose Uridina Difosfato
SAC-6-P	- Sacarose-6-fosfato
PI	- Fosfato inorgânico
GG	- Goma Guar (<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>)
GMPF	- Galactomanana de Pau-ferro (<i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i>)
GMPFP	- Galactomanana de Pau-ferro (<i>C. ferrea</i> var. <i>ferrea</i>) purificada
GMPFOXT	- Galactomanana de Pau-ferro oxidada
GMPFOX D	- Galactomanana de Pau-ferro N-alquilada/oxidada
RMN	- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
COSY	- Homonuclear Correlation Spetroscopy
HMQC	- Heteronuclear Multiplequantum Coherence
RF	- Radiofrequência
GPC	- Cromatografia de permeação em gel
RI	- Índice de refração
LALLS	- Espalhamento de Luz em baixo ângulo (7°)
RALLS	- Espalhamento de Luz em ângulo reto
GC	- Cromatografia em fase gasosa
GC-MS	- Cromatografia em fase gasosa acoplada à Espectro de Massas
MS	- Espectrometria de Massa

UV-VIS	- Região espectroscópica no Ultravioleta e Visível
FTIR	- Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier
CAC	- Concentração de agregação crítica
BSA	- Albumina de soro bovino
DMSO	- Dimetilsulfóxido
TFA	- Ácido trifluoracético
TEMPO	- N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina

LISTA DE SÍMBOLOS

ppm - Unidade em partes por milhão

δ - Deslocamento químico em ppm

m/z - Relação massa/carga

dn/dc - Relação do índice de refração e a concentração do polímero num determinado solvente

M_w - Massa molar ponderal média

M_n - Massa molar numérica média

R_g - Raio de giração

R_h - Raio hidrodinâmico

α - Constante de Mark-Houwink

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 BIOPOLÍMEROS	23
1.2 POLISSACARÍDEOS	23
1.3 GALACTOMANANAS	25
1.3.1 Propriedades das galactomananas.....	29
1.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E APLICAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS.....	32
1.4.1 Modificação química com N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO)	33
1.5. <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i>	37
1.6 FUNDAMENTAÇÃO DAS TÉCNICAS PARA CARACTERIZAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS	39
1.6.1 Caracterização estrutural por cromatografia em fase gasosa	39
1.6.1.1 Determinação da composição monossacarídica – Método de WOLFROM E THOMPSON (1963)	40
1.6.1.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas – Método de CIUCANU E KEREK (1984)	42
1.6.1.3 Cromatografia de permeação em gel.....	45
1.6.2 Métodos espectroscópicos para a caracterização de polissacarídeos.....	47
1.6.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	48
1.6.2.2 Espectroscopia de Infravermelho.....	50
1.6.2.3 Espectroscopia de Fluorescência	51
3 OBJETIVOS	55
3.1 OBJETIVO GERAL	55
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4 MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1 EXTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO	56
4.2 ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO BRUTA E PURIFICADA (GMPF E GMPFP)	57
4.2.1 Determinação de carboidrato total, proteína, umidade, massa residual e estabilidade térmica	57
4.3 ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO PURIFICADA (AMOSTRA GMPFP).....	58
4.3.1 Determinação da composição monossacarídica, através dos derivados acetilados, por cromatografia em fase gasosa (GC)	58
4.3.2 Identificação das ligações glicosídicas do polissacarídeo, a partir de derivados de acetatos de alditóis parcialmente metilados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectro de massas (GC-MS)	59

4.3.3 Análise dos polissacarídeos por cromatografia de permeação em gel (GPC) – determinação da distribuição das massas molares (M_n , M_w), tamanho molecular (R_h e R_g), viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e homogeneidade	60
4.4 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO BRUTA (GMPF) EXTRAÍDA DE SEMENTES DE <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (AMOSTRA GMPF)	61
4.4.1 Modificação química via oxidação	61
4.4.2 Modificação química por N-alquilação e oxidação.....	62
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA EXTRAÍDA DE SEMENTES DE <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (GMPF) E DOS DERIVADOS GMPFOXT E N- GMPFOXD POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	63
4.6 ANÁLISE ESTRUTURAL DA FRAÇÃO BRUTA (GMPF) E PURIFICADA (GMPFP) DE SEMENTES DE <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> E DE SEUS DERIVADOS (GMPFOXT E GMPFOXD) POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE HIDROGÊNIO (^1H) E CARBONO TREZE (^{13}C).....	63
4.6.1 Análise estrutural da galactomanana purificada (amostra GMPFP).....	63
4.6.2 Análise estrutural do material oxidado (GMPFOXT) e do material N-alquilado/oxidado (GMPFOXD)	64
4.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AGREGAÇÃO CRÍTICA (CAC) DA GALACTOMANANA DE <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (GMPF) E SEUS DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD) POR FLUORESCÊNCIA	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA (GMPF) EXTRAÍDA DA SEMENTE DE <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i>	66
5.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO POLISSACARÍDEO PURIFICADO (GMPFP), ATRAVÉS DOS DERIVADOS ACETILADOS, POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (GC).....	69
5.3. DETERMINAÇÃO DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS DO POLISSACARÍDEO PURIFICADO (GMPFP) A PARTIR DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-MS)	71
5.4 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA GALACTOMANANA DA <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (AMOSTRA GMPF).....	73
5.5 ANÁLISE ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO DE <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (GMPFP) E SEUS DERIVADOS (GMPFOXT E GMPFOXD) POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE HIDROGÊNIO (^1H) E DE CARBONO TREZE (^{13}C)	77
5.5.1 Análise estrutural da galactomanana purificada (amostra GMPFP).....	77
5.5.2 Análise dos polissacarídeos modificados via oxidação (GMPFOXT) e N-alquilação/oxidação (GMPFOXD) da galactomanana de Pau-ferro (GMPF) por ressonância magnética nuclear do carbono treze.....	84
5.6 CARACTERIZAÇÃO DA GALACTOMANANA DE <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (GMPF) E DOS SEUS DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD) POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	87

5.7 ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS POR CROMATOGRAFIA DE PERMEÇÃO EM GEL (GPC) – DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLARES (M_n , M_w), TAMANHO MOLECULAR (R_h E R_g), VISCOSIDADE INTRINSECA ($[\eta]$) E HOMOGENEIDADE.....	91
5.8. DETERMINAÇÃO POR FLUORESCÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE AGREGAÇÃO CRÍTICA (CAC) DA GALACTOMANANA DE <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i> (GMPF), DERIVADO OXIDADO (GMPFOXT) E DERIVADO N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD)	95
6 CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS	100
ANEXO 1 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA	114

1 INTRODUÇÃO

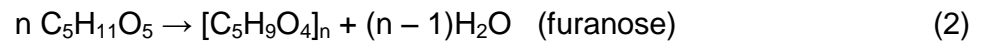
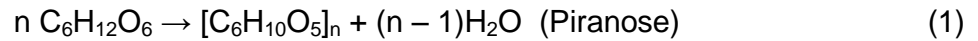
1.1 BIOPOLÍMEROS

Os biopolímeros constituem um grupo de materiais com inúmeras pesquisas, tendo em vista seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores (SILVA *et al.*, 2006). São macromoléculas obtidas através de processos químicos naturais, e são encontradas nos animais, vegetais e microorganismos. Essas biomoléculas desempenham diversas funções em processos metabólicos, e sua importância e atividade depende de sua estrutura e do grupo funcional ligado a ela. Dentro desse grupo, encontramos as proteínas, os polissacarídeos e os ácidos nucleicos (LEHNINGER, 2006). Comercialmente, os polissacarídeos se destacam devido à sua facilidade de obtenção e industrialização.

1.2 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, constituindo um grupo de compostos mais abundantes e importantes da biosfera como, por exemplo, a celulose e o amido, nas plantas, e o glicogênio nos animais (LEHNINGER, 2006). Esses polímeros são constituídos por dez ou mais unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas, diferindo-se entre si na unidade com cinco (furanosídeo) ou seis (piranosídeo) átomos de carbono, no grau de ramificação, no tipo de ligações e no comprimento de suas cadeias, apresentando diferentes composições e funções (LEHNINGER, 2006).

O processo de formação das longas cadeias poliméricas (podendo chegar a milhares de unidades monossacarídicas) ocorre através da policondensação das unidades e a formação da ligação glicosídica é formada após a eliminação de uma molécula de água entre duas moléculas adjacentes, de acordo com as seguintes equações empíricas:



Nos polissacarídeos, as unidades monossacarídicas estão na forma cíclica (furanosídica ou piranosídica), resultantes da reação intramolecular do grupo carbonílico em C-1 (polihidroxi-aldeído) ou em C-2 (polihidroxi-cetona) com grupos hidroxílicos em C-4 ou C-5 da estrutura em cadeia aberta, formando um hemiacetal ou hemiacetal cíclico de acordo com o mecanismo proposto da FIGURA 1.

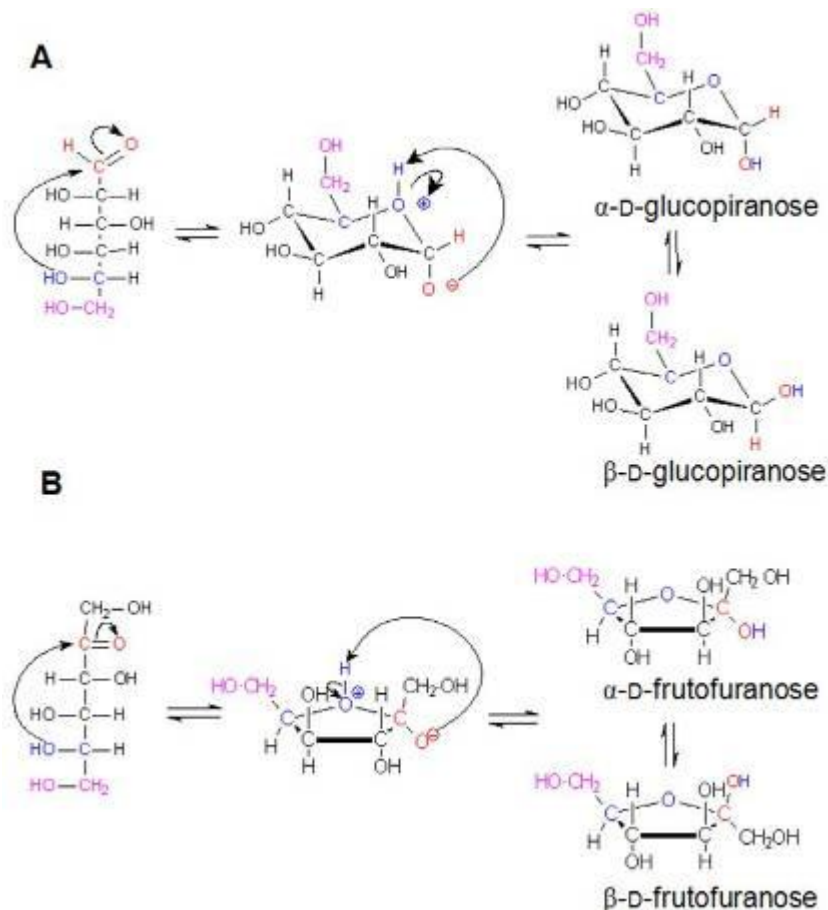


FIGURA 1 – MECANISMO DE FORMAÇÃO DA ESTRUTURA CÍCLICA DO MONOSSACARÍDEO ATRAVÉS DE UMA HEXOSE D-GLUCOPIRANOSE (A) E UMA PENTOSE D-FRUTOFURANOSE (B)

FONTE: COLLINS e FERRIER (1995)

Conforme visto na FIGURA 1, no processo de ciclização ocorre à formação dos estereoisômeros α e β do monossacarídeo. Dessa forma, os polissacarídeos

podem ser formados por longas cadeias com ligações do tipo α e β , e com diversos tipos e níveis de ramificação, o que torna a química de carboidratos ainda fonte de diversos estudos.

As principais características de interesse industrial em relação aos polissacarídeos são, em alguns casos, as formações de géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações, a compatibilidade com uma grande variedade de sais em ampla faixa de pH e temperatura, a estabilidade em elevadas concentrações iônicas, alta solubilidade em água em alguns casos (hidrocolóides) e, também, a possibilidade de ação sinérgica com outros polissacarídeos, que ocasiona uma melhora nas propriedades viscoelásticas ou na formação de géis em sistemas aquosos (DEA e MORRISON, 1975, SUDHAKAR *et al.*, 1996, CLOSS *et al.*, 1999, LUCYSZYN *et al.*, 2005, 2006).

Todas essas propriedades são diretamente dependentes das características químicas, físicas e estruturais de cada polímero, como massa molar, configuração anomérica (α e β), conformação (linear, ramificada, helicoidal, agregação entre cadeias), presença de grupos funcionais (carboxila, aminas e sulfatos, por exemplo), tipo (furanose ou piranose) e grau de substituição dos monômeros e a posição das ligações glicosídicas entre as unidades. Dessa forma, a caracterização química é necessária para o direcionamento de suas aplicações industriais.

1.3 GALACTOMANANAS

As galactomananas são polissacarídeos neutros, comumente encontrados no endosperma das sementes de algumas leguminosas (FIGURA 2A, 2B), onde desempenham papel de reserva. E também podem ser obtidas a partir de fontes microbianas, em particular leveduras e fungos (ANDRADE *et al.*, 1999, FERREIRA, 2008).

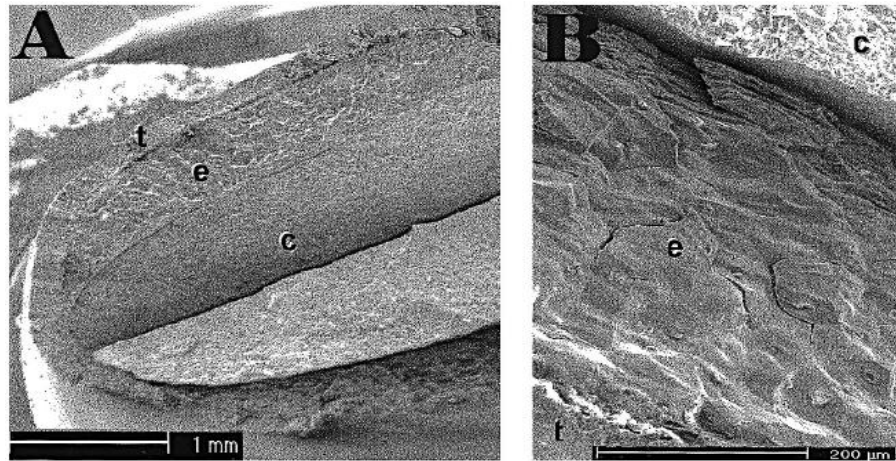


FIGURA 2 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA REGIÃO DO ENDOSPERMA DA SEMENTE DE UMA LEGUMINOSA (*Sesbania marginata*)

LEG.: t = testa, e = endosperma, c = cotilédone

FONTE: BUCKRIDGE (2000)

A galactomanana é composta de uma cadeia principal formada por unidades monossacarídicas de β -D-manopirranose (Man) unidas por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 4), substituídas em O-6, por unidades monossacarídicas de α -D-galactopirranose (Gal) (FIGURA 3), em graus variados, dependendo da espécie (WHISTLER *et al.*, 1953, DEA e MORRISON, 1975, DAAS *et al.*, 2000, SIERAKOWSKI *et al.*, 2000; CUNHA *et al.*, 2009).

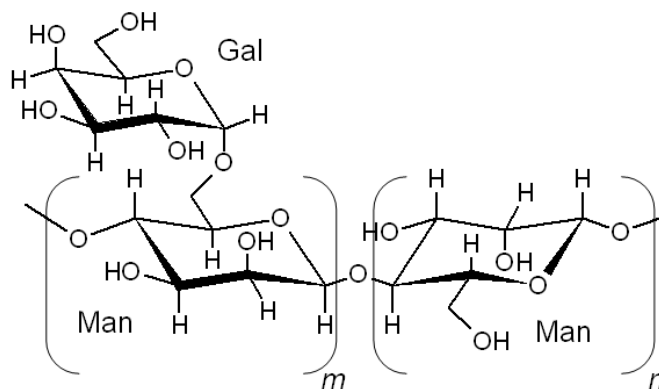


FIGURA 3 – ESTRUTURA PARCIAL DA GALACTOMANANA E SUAS RESPECTIVAS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS

LEG.: Man: manose, Gal: galactose

FONTE: SIERAKOWSKI *et al.* (2000)

Sendo uma das maiores famílias do reino vegetal, as leguminosas (com aproximadamente 18000 espécies) possuem um número elevado de espécies estudadas. A razão Man/Gal e a distribuição estatística das unidades de galactose ao longo da cadeia de manose variam de espécie para espécie, e três subfamílias das leguminosas (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae) podem ser diferenciadas por esta razão (BUCKRIDGE *et al.*, 2000).

Embora um grande número de espécies apresente estoques de galactomanana em suas sementes (BUCKRIDGE *et al.*, 2000), somente poucas têm seu metabolismo de germinação estudado em detalhes. Dentre as mais estudadas estão a Guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) (McCLENDON *et al.*, 1976), a Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) (REID, 1971) e a Locusta ou Alfarroba (*Ceratonia siliqua*) (BUCKRIDGE *et al.*, 2000).

Nas sementes de Guar e Fenugreek, o endosperma é duro e quase totalmente preenchido por galactomanana (BUCKRIDGE *et al.*, 2000). E nessas sementes são produzidas enzimas hidrolíticas por uma camada protéica de aleurona (camada de células que reveste o endosperma da semente) que promovem a quebra da parede celular do estoque do polissacarídeo, seguindo a germinação. Já nas sementes de *C. siliqua*, a célula do endosperma é flexível e a galactomanana é visualizada como uma parede mais espessa. Nesse caso, não há uma distinção entre o endosperma e a camada protéica, sendo as enzimas produzidas e liberadas, provavelmente, dentro da parede celular, pelas células endospermicas.

Alguns estudos relacionados com a mobilização de galactomanana em sementes confirmaram a presença de três enzimas hidrolíticas nesse processo (BUCKRIDGE *et al.*, 2000), liberando manose e galactose como produtos, gerando ao mesmo tempo sacarose. O processo catabólico da galactomanana está representado no esquema da FIGURA 4.

Aparentemente, a sacarose proposta na rota é para estoque (de carbono e energia) para o crescimento do embrião e o amido é temporariamente produzido no cotilédone (BUCKRIDGE *et al.*, 2000). DIRK *et al.* (1999) propuseram que a degradação da parede celular estoque e a síntese do amido estão bioquimicamente relacionados. McCLEARY *et al.* (1976) estudaram a mobilização da galactomanana de guar e verificaram que as fosfomanoisomerase e fosfoglucoisomerase tinham atividade no endosperma, sugerindo que essas enzimas são provavelmente

responsáveis pela epimerização da manose em glucose usadas na síntese da sacarose. Esses autores desenvolveram embriões com manose e galactose radioativas e demonstraram que os produtos da mobilização da galactomanana na guar são usados em diversos processos bioquímicos no desenvolvimento da planta.

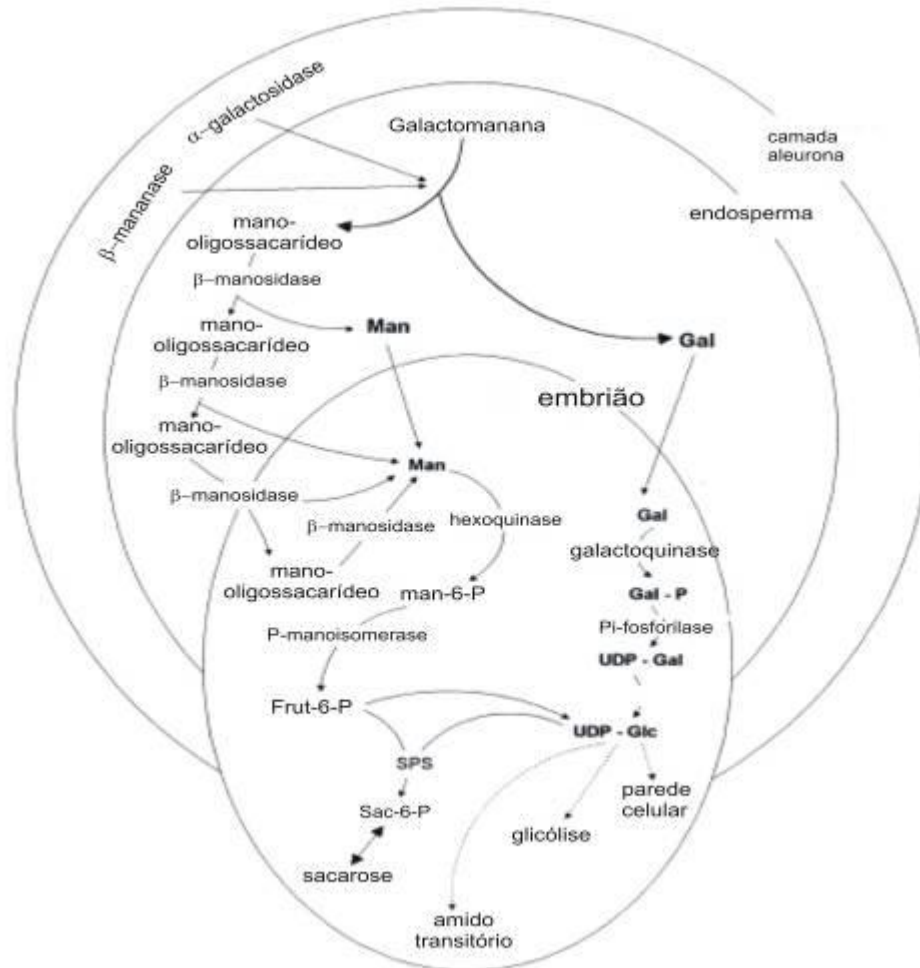


FIGURA 4 – ROTA BIOSSINTÉTICA ENVOLVENDO O CATABOLISMO DA GALACTOMANANA E SEUS PRODUTOS GERADOS NO EMBRIÃO DA SEMEIRA DE UMA LEGUMINOSA.

LEG.: Man → manose; Gal → galactose; SPS → sacarose fosfatosintase; Fru-6-P → frutose-6-fosfato; UDP-gal → galactose uridina difosfato; Sac-6-P → sacarose-6-fosfato; Pi → fosfato inorgânico

FONTE: BUCKRIDGE (2000)

1.3.1 Propriedades das galactomananas

O nível e a distribuição de galactose sobre a cadeia principal ocupam um papel importante nas propriedades físico-químicas do polímero (GANTER *et al.*, 1991). Segundo SIERAKOWSKI *et al.* (2000), há uma tendência ao aumento de solubilidade em água com o aumento de galactose, mas devido às grandes interações internas (ligações de hidrogênio), isso normalmente não é verificado, sendo observado um aumento da viscosidade da solução contendo a galactomanana, sendo considerada um bom espessante.

Devido a essa propriedade, a galactomanana foi descrita por DEA e MORRISON (1975) como uma goma, sendo esse termo utilizado no estudo desse polissacarídeo em outros trabalhos (MEYER *et al.*, 1982; FIGUEIREDO e PRICE, 1986; MEYER, 1984; BOBBIO, 1987; ABELLANE e FIGUEIREDO, 1988).

Comercialmente são utilizadas as galactomananas de Guar (*Cyamopsis tetragolobus* L. Taub), Locusta ou Alfarroba (*Ceratonia siliqua*) e goma Tara (*Caesalpineia spinosa*) (MAIER *et al.*, 1993). As principais diferenças entre as estruturas dessas galactomananas são as razões Man/Gal e a distribuição da galactose ligada à cadeia principal da manose (FIGURA 5) (ANDRADE *et al.*, 1999).

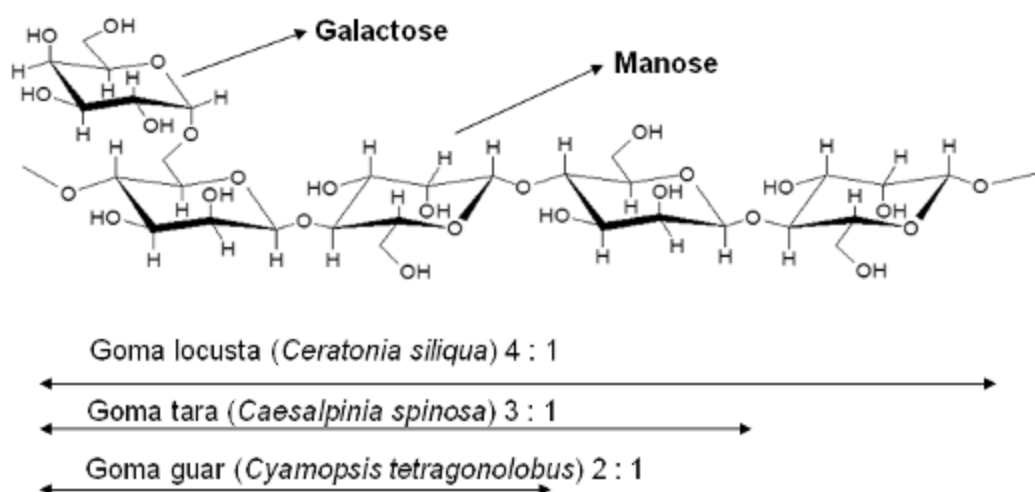


FIGURA 5 – COMPOSIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS DAS GALACTOMANANAS UTILIZADAS COMERCIALMENTE

Fonte: SITTIKJYOTHIN *et al.*, (2005)

Segundo SITTIKIJYOTHIN *et al.* (2005), os fatores massa molar e a razão Man/Gal são propriedades diretamente ligadas aos aspectos em solução da galactomanana, como viscosidade e efeito sinérgico que o polissacarídeo tem em solução. Os autores observaram que as gomas Guar e Alfarroba de M_w semelhante, apresentaram soluções viscoelásticas semelhantes, porém diferiram nas interações.

A fonte comercial de galactomanana mais utilizada é a semente de Guar, planta originária da Índia e do Paquistão, também cultivada nos Estados Unidos. Segundo os dados do Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior (2008), o Brasil importou no período de 01/1996 a 12/2008 16.569,7 toneladas de goma Guar e chegou a 5.882,7 toneladas de goma Locusta, com um gasto total de 51,35 milhões de dólares. Porém, as exportações para a Guar e a Locusta no mesmo período foram de 276,64 toneladas e 25 toneladas, respectivamente, gerando um rendimento de aproximadamente 931,641 mil dólares.

De acordo com o gráfico da FIGURA 6, que mostra um perfil de consumo e produção, o Brasil exporta uma quantidade muito maior em relação à produção interna, indicando uma baixa exploração desse mercado pelo país, o que também se faz necessário, pois seria vantajoso para as indústrias que utilizam essa matéria-prima no que diz respeito à redução de custos no processo.

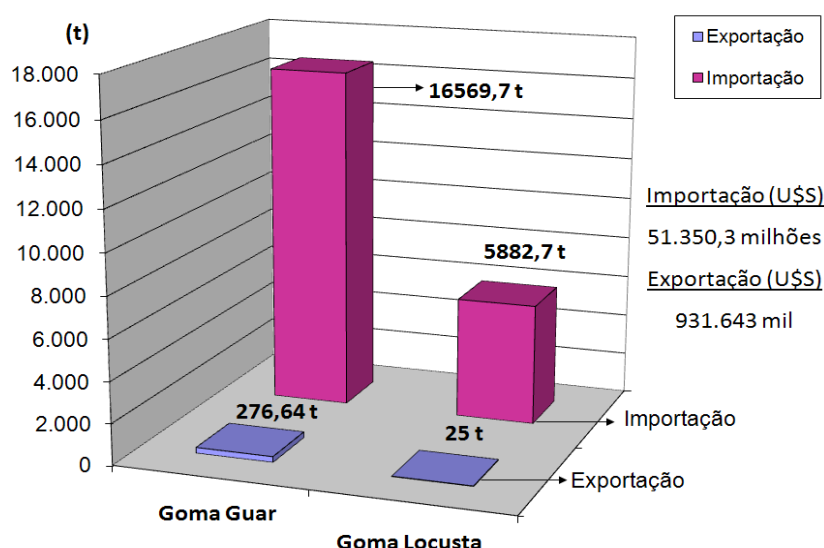


FIGURA 6 – DADOS REFERENTES À EXPORTAÇÃO E IMPORTAÇÃO DAS PRINCIPAIS GALACTOMANANAS COMERCIAIS (GOMA GUAR E LOCUSTA). PRODUÇÃO E CONSUMO NO PERÍODO DE 01/1996 A 12/2008

FONTE: Baseado em valores levantados no Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior (2008)

Com o objetivo de aumentar a exploração nesse nicho de mercado, vários trabalhos na literatura relataram a caracterização estrutural e os relacionados às propriedades de galactomananas de diferentes fontes, incluindo *Mimosa scabrella* (Bracatinga) (GANTER, 1988, SILVEIRA, 1991, GANTER *et al.*, 1992, 1993, 1995), *Stryphnodendron barbatimam* (LEITNER, 1991), *Senna multijuga* (RECCHIA, 1992), *Schizolobium amazonicum* (PETKOWICZ, 1993, 1998), *Schizolobium parahybae* (ZAWADZKI-BAGGIO, 1994), *Cassia fastuosa* (TAVARES, 1994), *Apuleia leiocarpa* (LUCYSZYN, 1994), *Cassia spectabilis* (KAPOOR *et al.*, 1998), *Caesalpinia pulcherrima* e *Cassia javanica* (ANDRADE *et al.*, 1999), *Leucaena leucocephala* (ONO, 2004) e *Dimorphandra gardneriana* Tul. (CUNHA *et al.*, 2009). Todas com alto rendimento de extração, em torno de 30% (m/m). As espécies citadas indicaram uma similaridade na estrutura e a maior parte delas também mostrou propriedades reológicas similares (GANTER *et al.*, 1992, GANTER e REICHER, 1999).

As galactomananas, como hidrocolóides, são importantes no processamento de alimentos por melhorarem a retenção de água, alterarem parâmetros de congelamento e de formação de cristais de água e, principalmente, por aumentarem a viscosidade de alimentos e outros produtos. Ajudam a obter mais corpo, texturas mais suaves, realçam o sabor, aroma e agem como emulsificantes e estabilizadores.

Em solução, misturas com outros polissacarídeos podem melhorar as características citadas. A interação amido/hidrocolóide foi tema de diversos trabalhos na literatura (CLOSS *et al.*, 1999; AHMAD e WILLIAMS, 2001, FREITAS *et al.*, 2003). Em soluções de amido com o hidrocolóide foram verificadas mudanças no comportamento reológico e térmico do amido, que indicou interação sinérgica desses materiais (SUDHAKAR *et al.*, 1996; MALI *et al.*, 2003; KAUR *et al.*, 2008).

VALENGA (2007) estudou a interação de galactomananas com alginato de sódio e verificou que, em sistemas contendo a goma, houve uma melhora nas curvas de viscosidade, sendo observada a formação de gel e estabilidade do sistema viscoelástico numa faixa de temperatura entre 20 a 40°C.

O efeito sinérgico atribuído às características estruturais do polímero pode também estar relacionado ao aspecto conformacional em solução, o qual envolve o processo de solubilização em um determinado solvente, que pode gerar regiões hidrofóbicas e hidrofílicas ao longo da cadeia polimérica (NEUMANN *et al.*, 2003). Essa informação é interessante, pois pode influenciar no processo de interação com

um determinado substrato. AMIJI (1995) estudou esse comportamento com a quitosana através de análises de fluorescência, utilizando pireno como substrato, onde foi possível verificar as faixas de concentração e agregação do polissacarídeo.

WANG *et al.* (2003) estudaram a relação da massa molar (M_w) e da concentração (C) da galactomanana na formação de soluções viscosas, e verificaram que além das variáveis massa e concentração, o tamanho da partícula também influencia na taxa de hidratação e, conseqüentemente, na viscosidade.

Anteriormente, ELLIS *et al.* (2001) verificaram que a viscosidade no trato gastrointestinal originada pela galactomanana era determinada pela relação M_w/C e que uma dispersão no meio era gerado pelo polímero hidratado.

1.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E APLICAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS

Nos polissacarídeos, as unidades podem passar por reações de modificação ou de conversão, produzindo moléculas de graus de complexidade variados. As razões que levam à modificação podem ser, por exemplo, aumentar ou diminuir o caráter geleificante, aumentar a retenção de água num determinado sistema, adicionar grupamentos hidrofílicos (mais solúvel em meio aquoso) ou hidrofóbicos (menos solúvel) e aumentar o poder emulsificante (WISTLER e BEMILLER, 1993).

VANDAMME *et al.* (2002) modificaram a galactomanana e outros polissacarídeos gerando materiais acetilados e metilados para aumentar a hidrofobicidade para um melhor excipiente para cólon. Outros materiais como glicoconjugados com proteínas ou compostos lipídicos que auxiliam no caráter hidrofílico e anfipático foram desenvolvidos para esse fim (SIERAKOWSKI *et al.*, 2000; CHIANDOTTI, 2005).

As vantagens da utilização de biopolímeros em processos biológicos, segundo SUMATHI (2002), incluem as características: não-carcinogênica, mucoadesividade, biocompatibilidade, alta capacidade de encapsulamento e liberação do fármaco de forma prolongada e a estabilidade térmica (base seca).

Algumas mudanças químicas sobre a estrutura de galactomananas e algumas aplicações foram estudadas na UFPR por GERMANO (1996) que analisou a atividade anticoagulante de galactomananas sulfatadas de *Mimosa scabrella* e

Cassia fastuosa. Estudos envolvendo reologia e a obtenção de géis pela substituição parcial de xantana por galactomanana foi efetuada por BRESOLIN (1997) e AMARAL (1999). PIRES (2001) estudou as propriedades biológicas após a sulfatação da galactomanana extraída de *Senna macranthera* e concluiu ter desenvolvido um ativo heparinóico. LUCYSZYN (2004) utilizou galactomananas como substituinte parcial do ágar em meio de cultivo; ONO (2004) avaliou a atividade antiviral de galactomananas sulfatadas e VALENGA (2007) avaliou por reologia misturas de galactomananas com alginato de sódio. KOOP *et al.* (2008) estudaram a estabilidade de géis utilizando galactomanana de *Mimosa scabrella* em mistura com a goma xantana. Outros trabalhos envolveram a complexação da galactomananas com diferentes íons (MERCÊ *et al.*, 1998, 2000, 2001).

Os estudos acima sugeriram várias aplicações das galactomananas na indústria como matéria-prima em produtos alimentícios, cosméticos, sequestrantes de metais e sistemas farmacêuticos, a partir de diferentes fontes vegetais, com a vantagem da disponibilidade das sementes o ano todo (CARVALHO, 1994), considerando que a produção (sazonalidade) é diferente para cada espécie e local.

1.4.1 Modificação química com N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO)

Reações de oxidação para obter aldeídos, cetonas ou ácidos carboxílicos são de fundamental importância em síntese orgânica. Apesar dos importantes avanços conseguidos, a oxidação quimiosseletiva de um grupo funcional álcool em presença de outros, bem como a oxidação seletiva de álcoois primários em presença de álcoois secundários, é geralmente de difícil acesso (SOUZA, 2004).

Grande quantidade de polissacarídeos naturais, como celulose, quitina e amido, produzidas anualmente podem ser quimicamente modificados para preparar novos bio-materiais. Entre elas, a oxidação seletiva do álcool primário rendendo ácidos poliurônicos, foi estudada há mais de meio século (MAURER e REIFF, 1943; YACKEL e KENYON, 1942). Ácidos poliurônicos são de grande interesse, uma vez que possuem valiosas propriedades específicas, variando a geleificação, complexação, anti-floculação, adesão, bem como uma série de atividades

biológicas, ampliando a utilização de biomateriais em áreas como têxtil, detergentes, tintas, cosméticos, medicamentos, alimentos, etc (FOLLAIN *et al.*, 2008).

Recentemente, um método para oxidar seletivamente álcoois primários de polissacarídeos foi descrito na literatura (NOOY *et al.*, 1994, 1995 e 1996; SIERAKOWSKI *et al.*, 2000; BRAGD *et al.*, 2000; KATO *et al.*, 2003). A técnica é baseada em uma reação catalisada pelo radical N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO), capaz de oxidar álcoois primários e secundários em condições brandas, seletivas e com tempo reacional reduzido, sendo utilizado em pequenas quantidades, podendo ser empregado em presença de sensíveis grupos funcionais. O TEMPO e outros compostos desta classe podem ser preparados pela oxidação em presença de peróxidos a partir das suas respectivas aminas *N,N*-disubstituídas. Uma outra grande vantagem na utilização do TEMPO como reagente de oxidação, é a sua não reatividade em presença de ar, luz ou umidade, podendo ser estocado e utilizado sem condições especiais, o que representa vantagem sobre um grande número de reagentes de oxidação (SOUZA, 2004).

De NOOY *et al.* (1995) descreveram um método para a oxidação seletiva de álcoois primários em polissacarídeos hidrossolúveis utilizando hipoclorito, brometo de sódio e o reagente TEMPO em quantidades catalíticas. No sistema NaOCl/NaBr (FIGURA 7) o radical TEMPO (I) é convertido no íon nitrozônio (II) que funciona como o agente oxidante frente ao polissacarídeo, sendo convertido em hidroxilamina (III), gerando um grupo funcional aldeídico no polissacarídeo.

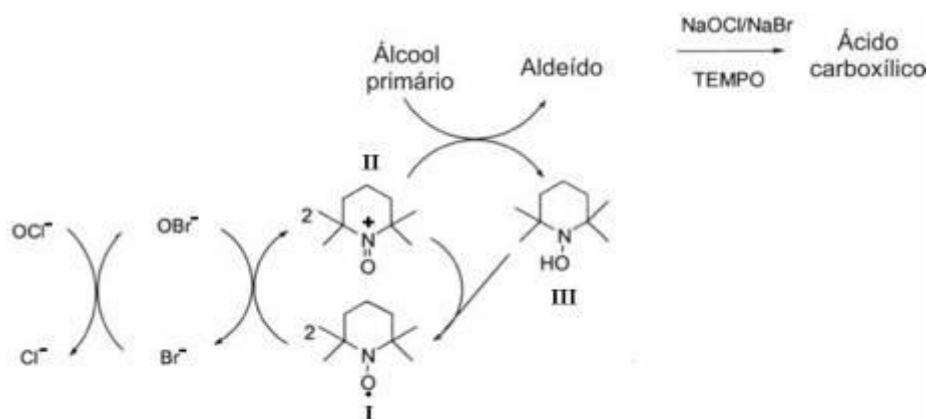


FIGURA 7 – REAÇÃO DE OXIDAÇÃO UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO (N-OXIL-2,2,6,6-TETRAMETILPIPERIDINA) NA CONVERSÃO DO ÁLCOOL A ALDEÍDO

LEG.: Forma radicalar TEMPO (I), íon Nitrozônio (II) e Hidroxilamina (III)

FONTE: BRAGD (2000)

Pelo processo de oxidação, o mecanismo de formação do intermediário aldeídico encontra-se na FIGURA 8.

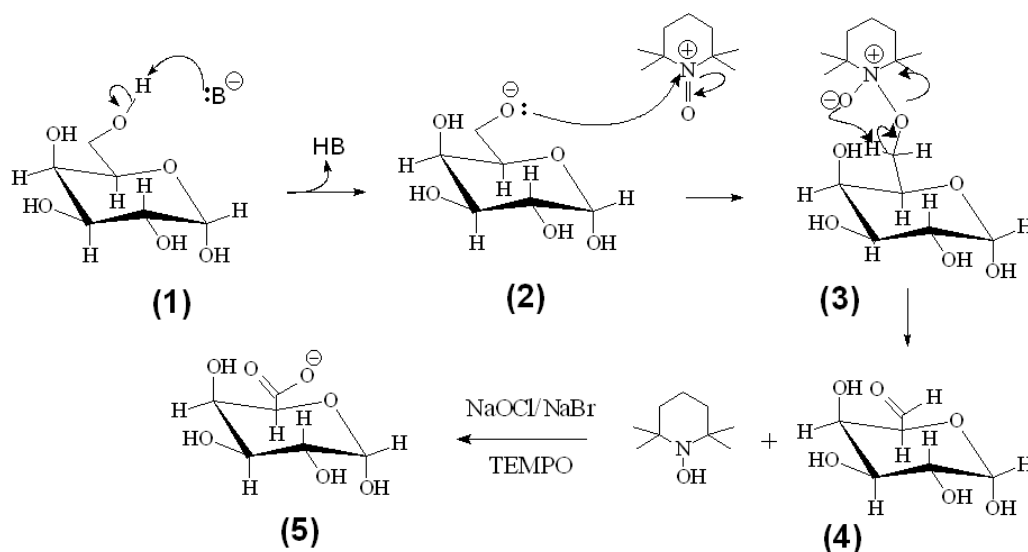


FIGURA 8 – MECANISMO PROPOSTO PARA CONVERSÃO DO ÁLCOOL PRIMÁRIO DA α -D-GALACTOPIRANOSE A ALDEÍDO E DEPOIS A ÁCIDO UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO, EM SISTEMA NaOCl/NaBr.

LEG.: (1) ataque nucleofílico; (2) ataque ao íon nitrozônio; (3) formação da carbonila na estrutura do monossacarídeo, gerando um composto aldeídico e a hidroxilamina (4); (5) formação do ácido carboxílico

A reação ocorre através do ataque de um nucleófilo ao hidrogênio da hidroxila primária (1), deixando o oxigênio com carga negativa, fazendo com que esse ataque o íon nitrozônio (2) o qual gera um oxigênio negativo na estrutura do reagente TEMPO. Esse, por sua vez, ataca o hidrogênio do carbono do polissacarídeo e o par de elétrons da ligação vai para ligação C-O (3), gerando a carbonila do aldeído e o TEMPO é convertido em hidroxilamina (4). No sistema NaOCl/NaBr, o TEMPO é convertido em íon nitrozônio para a continuação da reação e a conversão do aldeído em ácido carboxílico (5).

O processo de oxidação pode ser efetuado em meio básico ou ácido. Porém, segundo SOUZA (2004) em condições básicas os álcoois primários são oxidados preferencialmente, conforme também observado nos trabalhos de NOOY *et al.* (1994, 1995, 1996), SIERAKOWSKI *et al.* (2000) e BRAGD *et al.* (2000) que realizaram a reação nesse meio obtendo bons resultados na modificação específica.

SIERAKOWSKI *et al.* (2000) utilizaram o mecanismo de conversão do álcool a ácido carboxílico com o reagente TEMPO para inserir um grupo funcional aminoalquilado à estrutura de uma galactomanana, através do intermediário aldeídico, gerando um derivado com caráter anfifílico. O mecanismo proposto para a geração da GMPFOXD ligado a dodecilamina encontra-se na FIGURA 9.

1ª Etapa



2ª Etapa

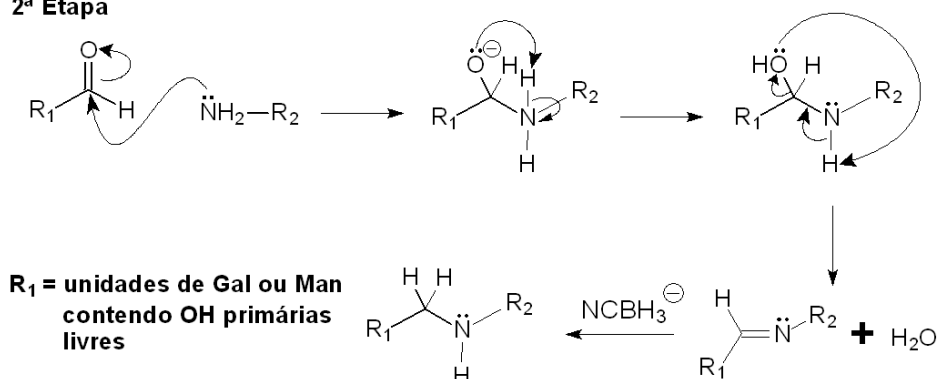


FIGURA 9 – MECANISMO PROPOSTO PARA A SÍNTESE DO POLISSACARÍDEO AMINOALQUILADO (GMPFOXD) PELA REAÇÃO COM O REAGENTE TEMPO, NaOCl EM pH ALCALINO E A REDUÇÃO COM O ÍON CIANOBOROHIDRETO

FONTE: O AUTOR (2008)

Em solução acontece o ataque dos íons hidroxila sobre um dos hidrogênios da amina protonada, o qual gera água e a amina primária na 1ª etapa da reação. A 2ª etapa da reação acontece após a formação do aldeído no meio reacional. O par de elétrons da amina ataca o carbono da carbonila e o par de elétrons da dupla ligação é cedido para o oxigênio. O oxigênio remove o hidrogênio da amina e em outra etapa ocorre a perda de água e a formação da dupla ligação gerando um produto com uma imina. A imina é então reduzida pelo íon cianoboroidreto presente no meio, gerando ao final uma amina secundária ligada ao C-6 do polímero original.

Dessa forma, a utilização do reagente TEMPO para reações de oxidação em concentrações catalíticas, tornou-se uma excelente alternativa para modificações em regiões específicas, podendo-se controlar o grau de conversão do álcool a ácido carboxílico, fornecendo estruturas com diferentes forças iônicas; e no caso dos

polissacarídeos, influenciando seu estado de agregação em solução e em diferentes sistemas de interação com ou sem o efeito da carga gerada na síntese.

1.5. *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*

A *Caesalpinia ferrea* é conhecida vulgarmente como Pau-ferro, Jucá, Ibirá-obi, Imirá-itá. De acordo com o Sistema de classificação Cronquist (1981), a taxonomia do Pau-ferro encontra-se no QUADRO 1.

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA PLANTA *Caesalpinia* var. *ferrea*

Taxonomia	
Divisão	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida (Dicotyledonae)
Subclasse	Rosidae
Ordem	Fabales
Família	Caesalpinaceae (Caesalpinioideae, Leguminosae)
Espécie	<i>Caesalpinia ferrea</i> Martius ex Tulasne var. <i>ferrea</i>

FONTE: Banco de dados de Espécies Arbóreas Brasileiras, Embrapa Floresta (<http://www.cnpf.embrapa.br/>), acesso em 2008

As árvores crescem em grande parte do Brasil, apresentando três variedades. A variedade *ferrea* (sinônimo: *Caesalpinia ferrea* var. *cearensis*) tem ocorrência predominante na Região Nordeste, sendo mais comum em regiões da Caatinga, onde é conhecida principalmente por Jucá. As outras duas variedades, *parvifolia* e *leiostachya*, são formas características da Floresta Atlântica, onde é espontânea no Rio de Janeiro (DUCKE, 1953; RIZZINI e MATTOS FILHO, 1968). As duas últimas variedades são bastante semelhantes, contudo, a var. *leiostachya* possui folhas de nove a onze pinas, e essas doze a 20 folíolos.

As árvores da *C. ferrea* atingem de 10-15 m de altura, com tronco curto de 40-60 cm de diâmetro. Folhas compostas bipinadas de 15-19 cm de comprimento, com 5-11 pinas opostas; folíolos em número de 8-24 por pina. Fruto/legume na forma de vagem indeiscente (não se abre quando maduro), muito duro e de cor escura (FIGURA 10).

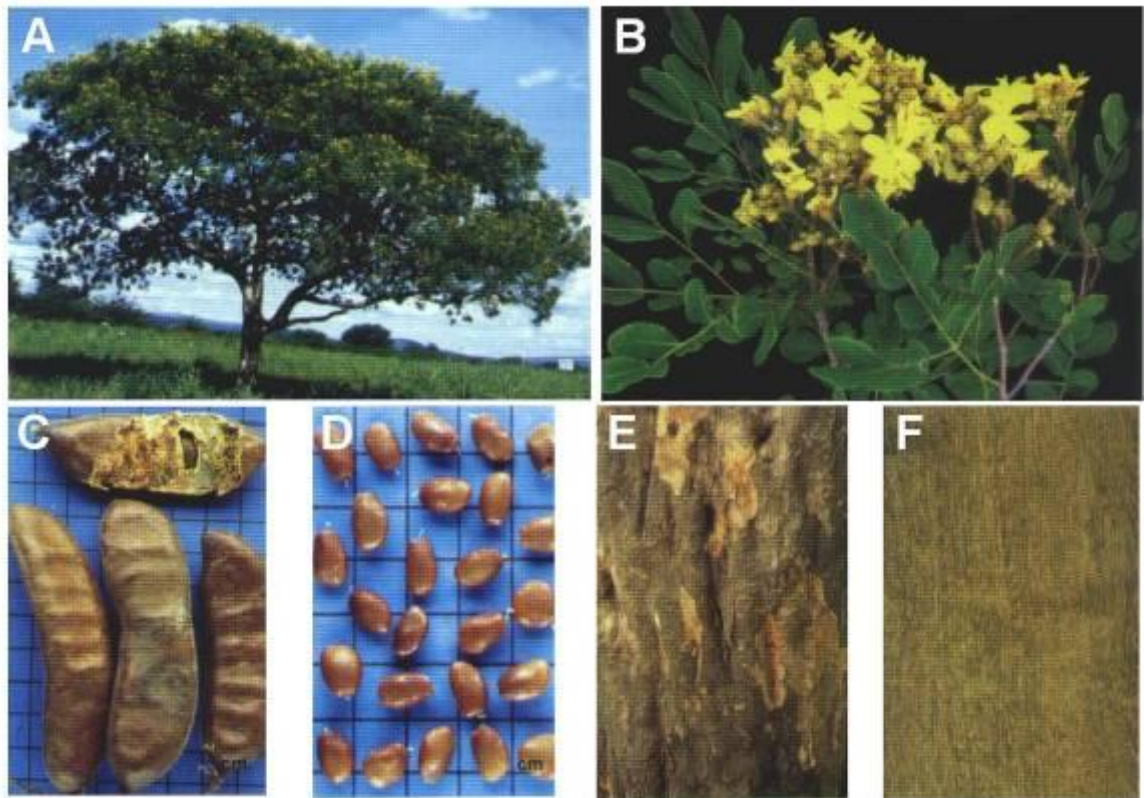


FIGURA 10 – ASPECTO MORFOLÓGICO DA *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*; ÁRVORE (A); FLORES E FOLHAS (B); VAGEM (C); SEMENTES (D); TRONCO VISÃO EXTERNA (E); TRONCO VISÃO INTERNA (F)

FONTE: LORENZI (1998)

É uma planta hermafrodita, com polinização efetuada por abelhas e insetos pequenos, com floração de outubro a maio, em São Paulo; de dezembro a fevereiro, em Pernambuco; em janeiro, em Minas Gerais, e em abril, no Rio de Janeiro. Plantada no Paraná, floresce de janeiro a março. Os frutos amadurecem de fevereiro a junho, em Pernambuco; de maio a dezembro, em São Paulo; de maio a outubro, em Minas Gerais, e de agosto a setembro, no Rio de Janeiro. Plantada no Paraná e no Rio Grande do Sul, frutifica de julho a setembro. O processo reprodutivo inicia aos três anos de idade, em plantios em sítios adequados (CARVALHO, 1994).

As sementes e a casca do Pau-ferro são usadas na medicina popular, na forma de chá e de garrafadas, para emagrecer, como depurativo e para contusões (BARROS, 1982). Os frutos possuem propriedades medicinais, principalmente no combate à anemia, às afecções hemoptísicas pulmonares (tosses seguidas de sangue) e diabetes. As raízes foram usadas como antifebril e antidiabético; e as

cascas como adstringentes e cicatrizantes (BRAGA, 1960). Nakamura *et al.* (2002a; 2002b) estudaram dois componentes extraídos do Pau-ferro, o ácido gálico e metil galato que apresentaram atividade anti-tumoral e anti-viral.

A obtenção das sementes é feita manualmente, utilizando cassetete ou martelo para quebrar a vagem. É possível a utilização de uma máquina trituradora de grãos, para o beneficiamento mecânico dos frutos (MELLO e ANTONIO, 1988). Para cada quilo bruto de vagem colhida, as sementes representam apenas 1 a 5 %, e o número delas é de 4500 por quilograma (CARVALHO, 1976). Além do polissacarídeo em estudo, a composição básica das sementes dessa espécie apresenta em média 3,46 % de cinzas, 8,09 % de proteínas, 7,80 % de amido e 3,30 % de óleo, sendo consideradas com um bom potencial para armazenamento a médio-longo prazo, devido ao baixo teor de óleo (BIRUEL *et al.*, 2000).

1.6 FUNDAMENTAÇÃO DAS TÉCNICAS PARA CARACTERIZAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS

1.6.1 Caracterização estrutural por cromatografia em fase gasosa

A Cromatografia gasosa (GC) é usada para separar componentes voláteis de uma mistura. Porém, grupos polares presentes nos carboidratos (hidroxil, amino, ácidos carboxílicos) não geram tais produtos. Alguns processos de derivatização desses grupos acabam aumentando a volatilidade (BIERMANN e MCGINNIS, 1990). Por exemplo, grupos hidroxílicos são comumente acetilados e metilados por diferentes métodos para a obtenção de materiais alquilados com volatilidade relativamente alta. Destacam-se aqui os métodos de WOLFROM e THOMPSON (1963) e CIUCANU e KEREK (1984), os quais serão discutidos a seguir.

1.6.1.1 Determinação da composição monossacarídica – Método de WOLFROM E THOMPSON (1963)

Conforme discutido anteriormente, grupos funcionais presentes na estrutura do carboidrato não geram produtos voláteis. No caso dos polissacarídeos, além dos grupos funcionais, o próprio tamanho e massa molar prejudicam a análise por GC. Dessa forma, WOLFROM e THOMPSON (1963) desenvolveram um método em que o material é primeiramente hidrolisado, gerando monossacarídeos que por um processo de derivatização são acetilados, fornecendo informações a respeito da composição monossacarídica do biopolímero.

De acordo com esse procedimento o material é primeiramente submetido a uma hidrólise ácida utilizando o ácido trifluoracético (TFA). A utilização do TFA tem a vantagem de ser removido do meio após a hidrólise, utilizando sistemas de evaporação em pressão reduzida ou sobre fluxo de nitrogênio seco (BIERMANN e MCGINNIS, 1990).

Seguindo o mecanismo de hidrólise (FIGURA 11) ocorre a protonação do átomo do átomo de oxigênio glicosídico (1), o qual gera o átomo conjugado (2), seguido pela quebra da ligação em O–C em C-1 da unidade monossacarídica, para dar o íon cíclico de carbono-oxônio (3), que apresenta uma conformação de meia cadeira (*half-chair*) com C-2, C-1 e C-5 no mesmo plano.

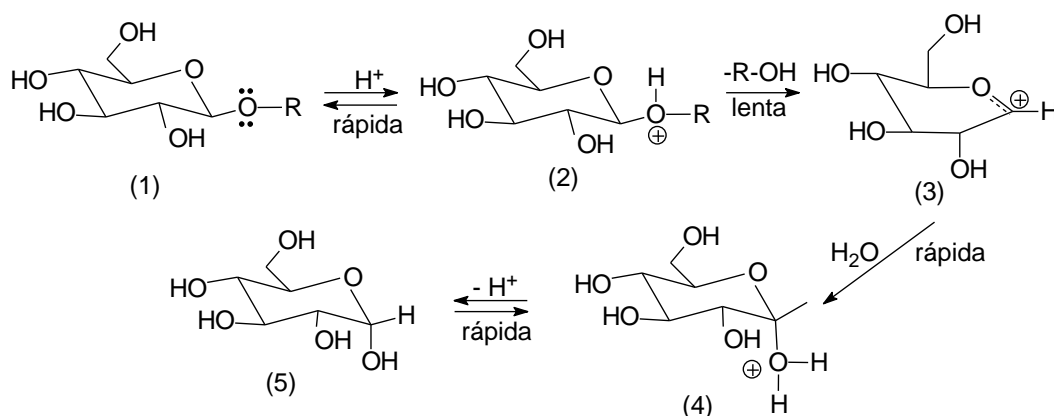


FIGURA 11 – MECANISMO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DE GLÍCOSÍDEOS. ETAPAS: (1)→(2): PROTONAÇÃO DO OXIGÊNIO GLÍCOSÍDICO; (3) FORMAÇÃO DO ÍON CÍCLICO CARBONO-OXÔNIO (*HALF CHAIR*); (4) FORMAÇÃO DO AÇÚCAR REDUTOR PROTONADO; (5) LIBERAÇÃO DO PRÓTON GERANDO AÇÚCAR REDUTOR

FONTE: EDWARD (1955); FOSTER e OVEREND (1955)

A reação do íon oxônio com a água gera o açúcar redutor protonado, e após desprotonação forma-se o açúcar redutor (EDWARD, 1955; FOSTER e OVEREND, 1955). O tempo de incubação em meio ácido é controlado para evitar a destruição das unidades monossacarídicas e para impedir a repolimerização, onde o polímero é reduzido a álcool com boroidreto. Então, o material é acetilado com anidrido acético em presença de um catalisador, nesse caso a piridina. A etapa de acetilação elimina as ligações de hidrogênio, resultando num material suficientemente volátil para análise de cromatografia em fase gasosa - GC (BIERMANN e MCGINNIS, 1990).

Assim, o material acetilado é injetado no cromatógrafo e carregado na fase gasosa. O processo ocorre pela eluição através do gás de arraste, nesse caso o hélio, que flui através do injetor e empurra os componentes gasosos da amostra para a coluna, conforme esquematizado na FIGURA 12.

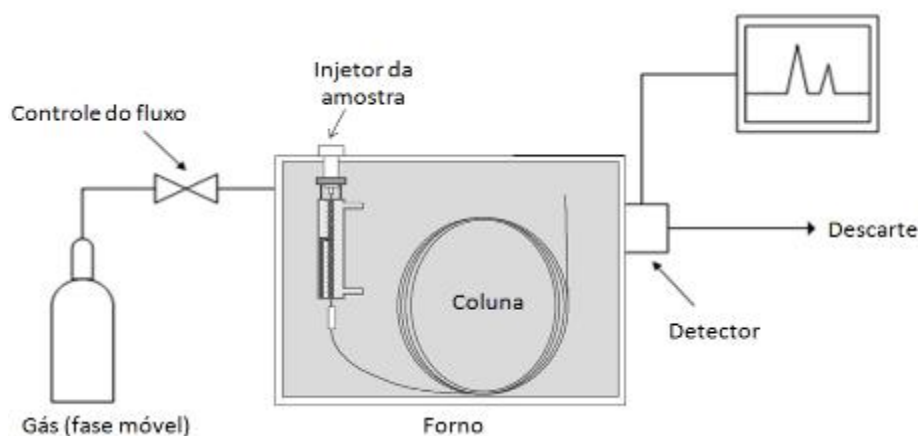


FIGURA 12 – ESQUEMA GERAL DE UM CROMATÓGRAFO EM FASE GASOSA (GC HEWLETT PACKARD 5890 – A série II)

Depois dos componentes da mistura passar pela coluna, eles atingem um detector em tempos diferentes, devido às diferentes forças de interação de cada componente durante a separação com as fases móvel e estacionária. O detector envia um sinal para um compilador de dados, ou computador, que gera gráficos de unidade de área em função do tempo de retenção, onde área do pico é proporcional ao número de moléculas que geram o sinal. O equipamento normalmente dispõe de referências pré-definidas de unidades monossacarídicas (padrões internos de

acetatos de alditóis), que facilitam a identificação da composição da amostra do polissacarídeo.

1.6.1.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas – Método de CIUCANU E KEREK (1984)

Cromatografia em fase gasosa e espectroscopia de massa são, em muitos aspectos, técnicas altamente compatíveis, onde as amostras se encontram em fase gasosa e, quando acopladas, há a necessidade de preparo de uma única amostra (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). Fundamentalmente, a mistura gasosa passa através da coluna, onde os compostos são separados de acordo com a interação com a fase estacionária. Após a eluição, os compostos entram direto no espectrômetro de massas e sofrem processo de fragmentação. Dessa forma, são gerados os cromatogramas e para cada pico é gerado um espectro de massa (FIGURA 13)

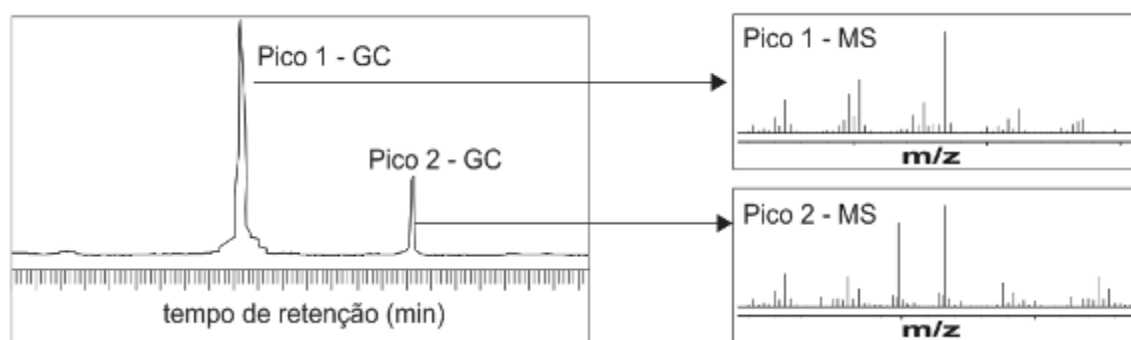


FIGURA 13 – RESULTADO DE UMA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS; O ESPECTRO DE MASSA CORRESPONDE A CADA PICO GERADO EM GC

FONTE: O AUTOR (2008)

Partindo da análise por GC-MS, a metilação é o processo de derivatização mais utilizado para análise das ligações químicas presentes no polissacarídeo. Várias são as técnicas que permitem a substituição do hidrogênio da hidroxila por um grupo metila como os métodos de HAWORTH (1915), KUHN *et al.* (1955),

HAKOMORI (1964) e usada com maior frequência o método de CIUCANU E KEREK (1984). A metilação dos polissacarídeos confere à análise estrutural vantagens na determinação da massa molecular, na composição monossacarídica, na sequência das unidades monossacarídicas, na posição das ramificações, nas ligações glicosídicas e aspectos de configuração e conformação dos isômeros (CIUCANU e COSTELLO, 2003).

O método de metilação é baseado na per-O-metilação de carboidratos seguido pela hidrólise ácida de monossacarídeos parcialmente metilados, redução aos seus correspondentes alditóis e acetilação dos grupos hidroxílicos recém-formados e, finalmente, análise em GC-MS. O mecanismo de O-metilação de carboidratos depende de várias etapas (FIGURA 14). O primeiro passo consiste em desprotonação dos grupos hidroxilas e outros grupos doadores, na presença de uma base (B^-). Nessa etapa são gerados grupos alcóxil (reação (1)).

Na segunda etapa, um reagente metilante, como o iodeto de metila (MeI), é adicionado à solução do alcóxido para produzir éteres metílicos (reação (2)), pelo ataque nucleofílico do íon alcóxil sobre o agente metilante. O alcóxido gerado é um nucleófilo mais forte que as hidroxilas do carboidrato. Essa etapa de metilação continua de acordo com a sequência de reatividade, que segue em hidroxilas primárias > secundárias.

Quando um grupo metila é introduzido, modifica a reatividade dos grupos hidroxilas vicinais. A reação (1) é um processo de equilíbrio, que depende da força e concentração da base, da reatividade dos grupos hidroxilas do carboidrato, do solvente, da temperatura e da taxa de remoção de BH, produto da reação. Esse equilíbrio vai ao sentido direto, pelo consumo dos alcóxidos na reação (2), eliminando rapidamente o produto BH formado na reação (1), na presença de bases fortes, em solventes polares.

A natureza do grupo alcóxil afeta a posição de equilíbrio. Se o grupo for volumoso, pode exercer um efeito estérico e retardar a taxa de conversão. O consumo de íons alcóxil na reação (2) depende da reatividade do alcóxido e do agente metilante no meio reacional.

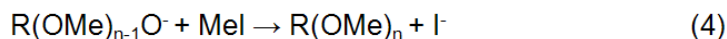
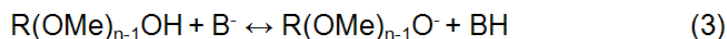
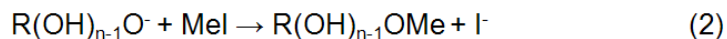
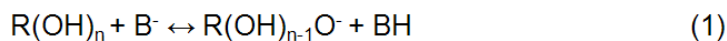


FIGURA 14 – ESQUEMA DO PROCESSO DE METILAÇÃO PROPOSTO POR CIUCANU, 2006. (1) FORMAÇÃO DO ALCÓXIDO, (2) METILAÇÃO POR IODETO DE METILA, (3) (4) PROCESSO DE METILAÇÃO NAS HIDRÓXILAS SECUNDÁRIAS, (5) FORMAÇÃO DA BASE CONJUGADA (I⁻) EM MEIO ALCALINO

FONTE: CIUCANU (2006)

A completa conversão das hidroxilas do carboidrato em alcóxido exige um meio reacional aprótico e anidro. Quando a metilação é realizada sobre essas condições, a conversão ocorre com maior eficiência (CIUCANU, 2006). Entre halogenetos, o íon iodeto é o melhor grupo abandonador, porque é a base conjugada mais fraca, por isso do seu uso.

Pelo método de CIUCANU e KERÉK (1984), a amostra é solubilizada em ambiente anidro, utilizando o dimetilsulfóxido (DMSO), um agente alquilante (iodeto de metila) e o hidróxido de sódio seco, conforme mostrado na FIGURA 15.

Após, ocorre a conversão dos derivados O-metilados via sucessivas hidrólises, redução com boroidreto de sódio e por último acetilação, gerando produtos que são identificados por GC-MS através dos respectivos tempo de retenção e espectros de massas característicos de sua estrutura.

A caracterização dos derivados via GC-MS é bem documentada na literatura, a qual é facilitada com referências que auxiliam na identificação de fragmentações, conforme trabalhos de JANSSON (1976), ASPINALL (1982), BIERMANN e MCGINNIS (1990) e SASSAKI *et al.* (2005) que forneceram os tempos de retenção e as prováveis fragmentações para as diferentes unidades.

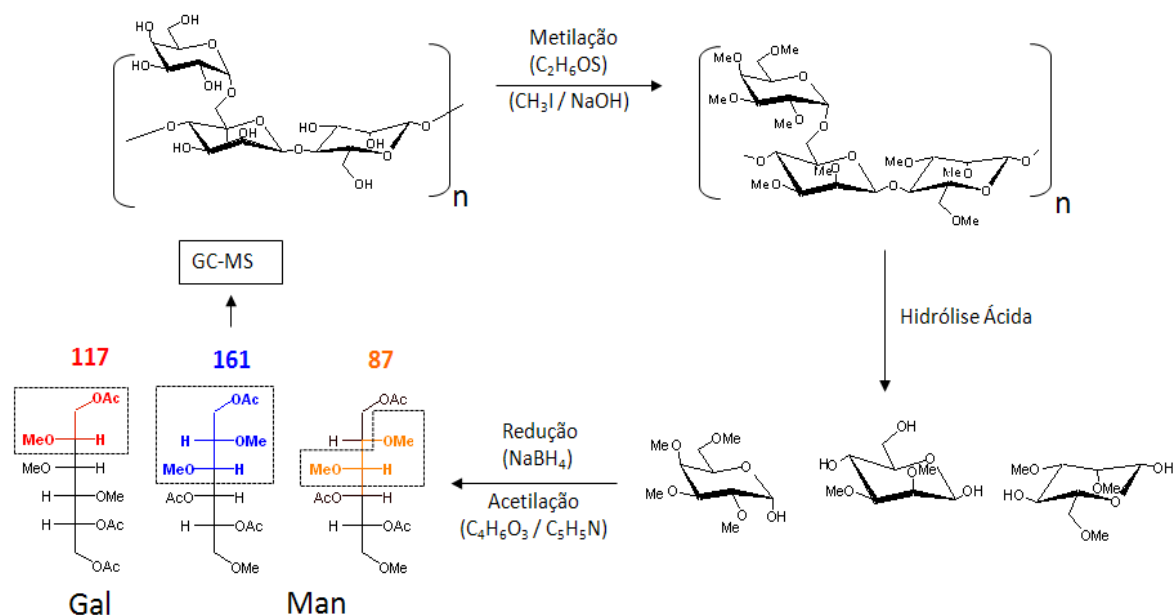


FIGURA 15 – ETAPAS DO PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO POR METILAÇÃO PELO MÉTODO DE CIUCANU E KEREK (1984). OS VALORES ENTRE AS LINHAS PONTILHADAS INDICAM POSSÍVEIS FRAGMENTAÇÕES NO ESPECTRO DE MASSAS

1.6.1.3 Cromatografia de permeação em gel

A Cromatografia de permeação em gel (GPC ou SEC, do inglês *Gel permeation chromatography* ou *Size exclusion chromatography*) se tornou um método convencional para determinação das distribuições de massa molar (M_{WD}) de diversos materiais poliméricos. O conhecimento da massa molar (MM) e sua distribuição são importantes para a aplicação e processabilidade do polímero. A cinética de reações do polímero, como síntese, transformações químicas e também degradação das macromoléculas, podem ser avaliadas eficazmente através das mudanças da M_w , além de fornecer informações importantes sobre a composição química, ramificação da cadeia e comportamento em solução (EREMEEVA, 2003).

O princípio de operação do GPC consiste na separação das moléculas com base em seu raio (R_h) ou volume (V_h) hidrodinâmico, e não pela massa molar. O processo de separação ocorre pelas colunas, que são empacotadas com materiais de diferentes tamanhos de poros como géis de poliestireno, esferas de vidro, sílica gel, entre outros (SANZ e MARTÍNEZ-CASTRO, 2007; KUNJI, 2008). Devido ao

tamanho, as grandes moléculas não podem eluir pelos poros, ocorrendo uma eluição mais rápida pelas regiões de empacotamento da coluna, ocorrendo o contrário com as moléculas menores. A FIGURA 16 ilustra o mecanismo de separação por exclusão de tamanho nas análises por GPC.

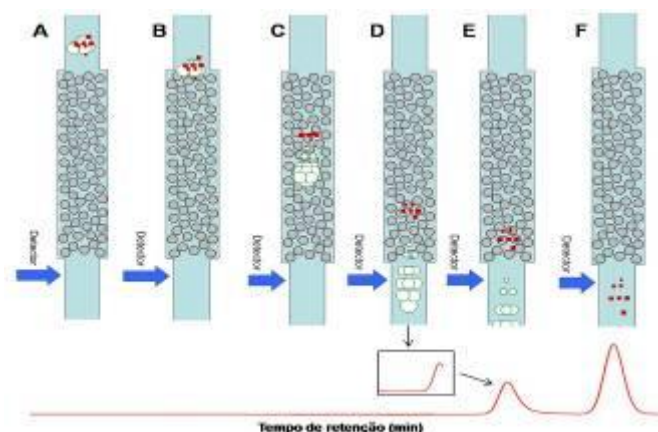


FIGURA 16 – PRINCÍPIO DE OPERAÇÃO DE UMA COLUNA DE GPC POR EXCLUSÃO DE TAMANHO (SEC – SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY).

LEG.: (A) INJEÇÃO DA AMOSTRA; (B) ELUIÇÃO PELA COLUNA; (C) SEPARAÇÃO DAS MOLÉCULAS PELO SEU RAIO HIDRODINÂMICO (R_h); (D) SAÍDA DAS MOLÉCULAS COM MAIOR R_h PRIMEIRO; (E) SAÍDA DAS MOLÉCULAS COM MENOR R_h .

FONTE: VISCOTEK (<http://www.viscotek.com/the-gpc-sep.aspx>)

Quando a separação por GPC está acoplada a detectores avançados, como espalhamento de luz (LS do inglês - *Light scattering*), detector viscosimétrico e de concentração, diversos tipos de calibrações e/ou cálculos são utilizados para calcular parâmetros como massa molar (M_w e M_n), distribuição de massa molar (M_{WD}), viscosidade intrínseca (IV) ou densidade molecular, raio hidrodinâmico (R_h), e raio de giração (R_g).

Os valores de M_w e M_n obtidos por GPC são determinados por uma relação entre a integração dos picos do índice de refração (RI) e o espalhamento de luz em ângulo baixo (LALLS), sendo este método adotado para a determinação da massa absoluta para moléculas grandes (BEER *et al.*, 1999) e pelas medidas por espalhamento de luz (LALLS e RALLS) são obtidos os valores de raio de giração (R_g) das galactomananas. O R_g é considerado como a medida da distância das

pontas da cadeia do polímero, ao contrário do raio ou volume hidrodinâmico (R_h) que considera a cadeia polimérica como uma esfera (AZERO e ANDRADE, 2002).

Vários trabalhos na literatura reportam a utilização da cromatografia de gel permeação na caracterização e controle de carboidratos. FROLLINI *et al.* (1995), realizaram uma modificação enzimática sobre a goma guar monitorando por GPC, e observaram a variação da polidispersão (relação M_w/M_n) e diminuição da MM. CHENG *et al.* (2002) estudaram a distribuição das diferentes massas molares da goma guar ocasionadas por hidrólise ácida e enzimática, avaliando após a degradação a polidispersão e os parâmetros de Mark-Houwink ($[\eta]=K.M_w^\alpha$) em solução das frações do polissacarídeo observando também que uma variação nos parâmetros pelo efeito de agregação entre as cadeias do polímero.

Com o aperfeiçoamento da técnica a amostra que antes era separada, eluída pela coluna do GPC e caracterizada pelo detector em uma única concentração (calibração convencional), atualmente é analisada por uma série de detectores (calibração universal ou detecção tripla), sendo que as medidas estudadas e discutidas anteriormente podem ser determinadas diretamente através de uma pequena quantidade de amostra (BEER *et al.*, 1999).

1.6.2 Métodos espectroscópicos para a caracterização de polissacarídeos

A espectroscopia faz parte da classe de métodos analíticos que se baseiam na interação da matéria com a energia radiante incidente, sendo que a energia resultante após a incidência pode ser refletida, transmitida ou absorvida.

Especificamente, na química de carboidratos existem técnicas espectroscópicas que são amplamente utilizadas. Quando um polissacarídeo é isolado, usualmente verifica-se o teor de carboidrato (ou açúcar total) presente no material. Um dos métodos mais utilizado até hoje para medir este teor é o ensaio por sistema fenol/ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), no qual se baseia na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres, após desidratação por ácido sulfúrico e posterior complexação dos produtos formados com o fenol (SILVA *et al.*, 2003).

Outro método utilizado na etapa preliminar de caracterização do polissacarídeo é a determinação do teor de proteína utilizando o reagente Folin-Ciocalteu com leitura na região do UV. No método desenvolvido por LOWRY *et al.* (1951) e posteriormente aperfeiçoado por HARTREE (1972), é baseado na redução do reagente Folin-Ciocalteu pela proteína, peptídeos e aminoácidos. A redução ocorre diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas (ZAIA *et al.*, 1998).

1.6.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das mais poderosas técnicas espectroscópicas no estudo de aspectos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas em solução (KAISER, 2000). Para a química de carboidratos se tornou uma ferramenta largamente utilizada; e com os avanços de técnicas de RMN bidimensional, se torna imprescindível sua utilização, principalmente na elucidação estrutural de polissacarídeos com estruturas complexas.

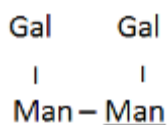
Dentre as técnicas de RMN utilizadas estão a do hidrogênio (^1H) e de carbono treze (^{13}C) e correlações homonuclear (^1H - ^1H), como o COSY (homonuclear **C**ORRELATION **S**PECTROSCOPY) e heteronuclear (^{13}C - ^1H) HMQC (**H**ETERONUCLEAR **M**ULTIPLE **Q**UANTUM **C**OHERENCE).

Pelas análises de RMN várias informações podem ser obtidas a respeito da estrutura do polissacarídeo. Diversos trabalhos na literatura relatam aspectos de galactomananas de diferentes fontes em relação aos resultados obtidos por RMN, indicando similaridade nos deslocamentos químicos desses polissacarídeos. Dessa forma, as ressonâncias do hidrogênio (^1H) e do carbono (^{13}C) podem ser atribuídas baseadas em dados reportados na literatura (GRASDALEN e PAINTER, 1980; MANZI e CEREZO, 1986; KAPOOR *et al.*, 1998; PETKOWICZ *et al.*, 1998; JOSHI e KAPOOR, 2003; VIEIRA *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2009).

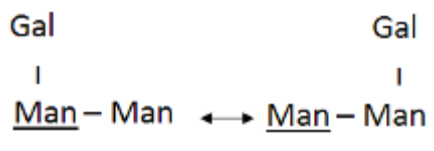
Na região entre δ 76-78 do espectro ^{13}C -RMN de galactomonanas se encontra o deslocamento referente ao C-4 das unidades da manose, que pode ser utilizada para os estudos da distribuição das unidades de α -D-galactopiranosose ao longo da cadeia principal do polissacarídeo. O estudo da probabilidade de substituição sobre a cadeia de β -D-manopiranosose é bem documentado na literatura (GRASDALEN e PAINTER, 1980; MANZI e CERESO, 1986; KAPOOR *et al.*, 1998; PETKOWICZ *et al.*, 1998; JOSHI e KAPOOR, 2003; VIEIRA *et al.*, 2007).

Segundo esses desdobramentos em C-4, DEA e MORRISON (1975) propuseram três possibilidades, picos I-III referentes às díades indicadas a seguir, para a distribuição das substituições de unidades de galactose ao longo da cadeia principal da β -D-manopiranosose, ou seja, para a estrutura fina da molécula:

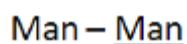
Pico I) Arranjo regular



Pico II) Arranjo irregular



Pico III) Arranjo em blocos



A unidade envolvida na formação do sinal está sublinhada. A distribuição das unidades da α -D-galactopiranosose é obtida através da integração dos sinais, fornecendo informações sobre o grau de substituição (Man/Gal) da galactomanana e similaridade com outras fontes (DEA e MORRISON, 1975).

Conforme esses e outros trabalhos reportados na análise por ressonância magnética nuclear, como os de CHAUBEY e KAPOOR (2001), estudando a estrutura da galactomanana da *Cassia angustifolia*, de GORIN *et al.* (2006) no estudo da estrutura de gomas exudadas de diversas plantas utilizando técnicas bidimensionais, de CUNHA *et al.* (2009) na caracterização da galactomanana da

Dimorphandra gardneriana e de FOLLAIN *et al.* (2008) por técnicas mono e bidimensionais, verificando a formação de derivados amidados na celulose, pode-se obter informações a respeito da estrutura do polímero, como o grau de substituição das unidades monossacarídicas, a distribuição dos substituintes ao longo da cadeia principal e a caracterização de derivados gerados a partir de modificação química.

1.6.2.2 Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica que pode fornecer informações sobre a estrutura molecular (THYGENSEN *et al.*, 2003).

Na molécula, todos os movimentos podem ser descritos em termos de dois tipos de vibrações, o estiramento e a deformação. O estiramento é um movimento rítmico e linear entre os átomos de modo que a distância interatômica vai aumentando ou diminuindo. Já a deformação ou flexão, resulta da mudança do ângulo de ligação. Cada um desses dois tipos de vibrações pode ter variações. O estiramento pode ser simétrico ou assimétrico, e a deformação pode ocorrer no plano ou fora do plano da molécula. A FIGURA 17 mostra as principais variações observadas em cada uma das situações quando analisadas por espectroscopia vibracional.

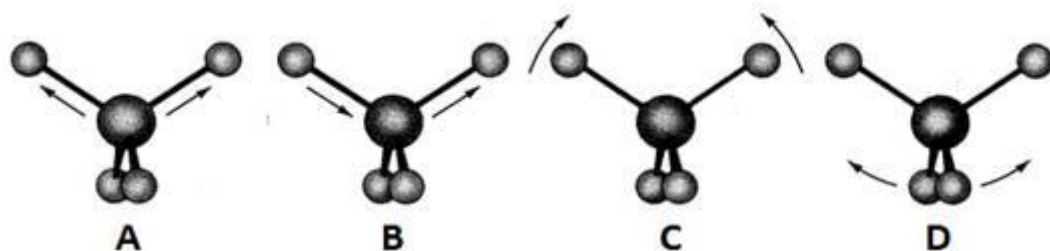


FIGURA 17 – ASPECTO DAS VIBRAÇÕES DA MOLÉCULA OBSERVADAS EM ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE INFRAVERMELHO (IR);

LEG.: (A) ESTIRAMENTO SIMÉTRICO, (B) ESTIRAMENTO ASSIMÉTRICO, (C) DEFORMAÇÃO ANGULAR NO PLANO E (D) DEFORMAÇÃO ANGULAR FORA DO PLANO

FONTE: <http://www.atomcrafters.com/INSTRUMENTS/IR.htm> (acesso em 2009)

Quando a amostra é irradiada com luz infravermelha, os átomos da estrutura molecular podem absorver essa energia e, dependendo do tipo de ligação química que esse átomo está conectado, influenciam na frequência de vibração ou rotação. A condição para que ocorra a absorção da radiação infravermelha é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional (THYGENSEN *et al.*, 2003; FERREIRA, 2008).

Para polissacarídeos em geral, diversos trabalhos utilizam a espectroscopia de infravermelho como ferramenta qualitativa para observar possíveis mudanças na estrutura do polímero, posterior a uma modificação química, assim como no controle de qualidade. KIZIL *et al* (2002), utilizaram a técnica de IR para monitorar possíveis mudanças estruturais no amido, após irradiação no controle de microorganismos.

Em recente trabalho, FERREIRA (2008) estudou o comportamento vibracional dos polissacarídeos por espectroscopia do infravermelho e Raman, identificando estiramentos e deformações característicos da estrutura de padrões de amilose e amilopectina, amidos de mandioca e de milho, galactomananas de Pau-ferro e Guar e xiloglucanas de Tamarindo e Jatobá; e observou diferenças no modo vibracional dos polissacarídeos de diferentes fontes, fornecendo grandes informações que podem ser utilizadas em trabalhos posteriores na elucidação estrutural de um determinado polissacarídeo.

1.6.2.3 Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência ocorre pela excitação dos elétrons, principalmente os que possuem transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (fluorescência intensa), ou em moléculas com ligações duplas altamente conjugadas (baixo sinal de fluorescência) (WHITE *et al.*, 2005). Quando o elétron volta a seu estado fundamental, gera radiação que é detectada conforme observada na FIGURA 18. Pela figura, observa-se que ocorre uma diminuição da polaridade do meio quando se aumenta o comprimento de onda (λ). Portanto, o fluoróforo é extremamente sensível a polaridade do ambiente em que se encontra. O pireno é um exemplo dessa sensibilidade, pois tende a interagir com regiões mais hidrofóbicas do meio, variando

nas intensidades de emissão das bandas vibrônicas na fluorescência (DONG e WINNIK, 1982; DOWLING e THOMAS, 1990).

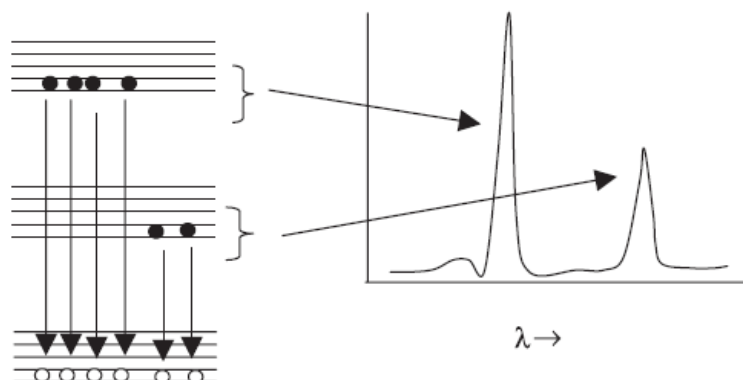


FIGURA 18 – ESPECTRO DE EMISSÃO GERADO PELO RETORNO DO ELÉTRON DO SEU ESTADO EXCITADO, OBTIDO POR ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

FONTE: WHITE *et al.* (2005)

Dessa forma, o pireno é largamente utilizado como sonda fotofísica (fluoróforo) para estudar as características de diversos surfactantes em solução, pela variação da hidrofobicidade em que se encontra, tendo uma tendência a formar sistemas agregados e/ou micelas.

As propriedades termodinâmicas de compostos anfifílicos em solução aquosa são controladas pela tendência da região hidrofóbica em evitar contato com a água, o que foi chamado de *efeito hidrofóbico*. Estes agregados se formam espontaneamente em concentrações suficientemente altas do componente anfifílico, acima da *concentração micelar crítica* (CMC) (UEDA, 2006).

A utilização dessa técnica vem aumentando devido à sensibilidade do método, sendo aproveitado para estudar o comportamento em solução de sistemas de liberação controlada de materiais encapsulados, tendo vários estudos na área biomédica (XIONG *et al.*, 2005).

Verificar o comportamento do polímero em solução por fluorescência é interessante em grande parte pela sensibilidade da análise, visto que o comportamento de fluoróforos em solução é utilizado para investigar ambientes com maior, ou menor hidrofobicidade (AMIJI, 1995). Em muitos estudos, o pireno é utilizado como sonda fotofísica responsável pela emissão na região de

fluorescência. A sua intensidade de emissão está associada fortemente com a polaridade do sistema, se alocando preferencialmente em domínios hidrofóbicos na molécula (DONG e WINNIK, 1982; DOWLING e THOMAS, 1990).

Quando o pireno é incorporado ao polímero em solução começa a ocupar um microambiente mais rígido, e a intensidade de fluorescência (pico III) tende a aumentar. Isso fica evidente observando o seu espectro de emissão (FIGURA 19).

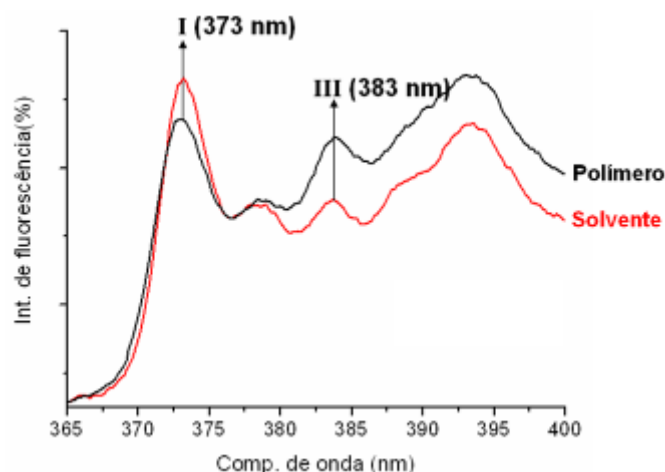


FIGURA 19 - EFEITO DA ADIÇÃO DO POLÍMERO EM RELAÇÃO AO SOLVENTE NA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO, VARIAÇÃO DO PICO (I), AMBIENTE MENOS HIDROFÓBICO E PICO (III) AMBIENTE MAIS HIDROFÓBICO

FONTE: O AUTOR (2008)

De acordo com a FIGURA 19, existem 4 picos relacionados a emissão e o grau de polaridade do pireno na solução, destacando os picos I e III, por apresentarem linearidade com a variação do microambiente em que se encontra a sonda fotofísica. O pico I (λ 373 nm) está relacionado com ambientes com menor hidrofobicidade e o pico III (λ 383 nm) com a maior (AMIJI, 1995; DOWLING e THOMAS, 1990). Ao relacionar o pico III com o pico I (III/I) é possível obter a concentração de agregação crítica (CAC) ou em alguns sistemas também definida como a concentração micelar crítica (CMC) (KALYANASUNDARAM e THOMAS, 1977).

2 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Os polissacarídeos constituem uma das mais abundantes e diversificadas famílias de biopolímeros. A sua estrutura primária, de acordo com a fonte, varia em composição, seqüência, massa molecular, configuração anomérica, posição de ligações e densidade de carga. As permutações dessas variáveis podem dar origem a diferentes formas de estruturas e de conformação, as quais refletem em uma grande variação de propriedades, usadas em muitas aplicações. As características de interesse comercial são tão diversas quanto são esses materiais, cobrindo o espectro de produtos químicos corriqueiros até especialidades químicas lucrativas para usos terapêuticos e de alta tecnologia. Entre esses biopolímeros, como exemplos importantes, estão as galactomananas que, de acordo com as propriedades físico-químicas, podem ser usadas como agentes espessantes, estabilizantes, emulsificantes, floculantes e inibidores de sinerese, sendo muito utilizadas em indústrias alimentícias, cosméticas, farmacêuticas e têxteis.

No Brasil, as fontes comerciais de galactomanana mais utilizadas são obtidas de semente de *Cyamopsis tetragonolobus* (goma Guar) e *Ceratonia siliqua* (alfarroba). Segundo os dados do Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior (2008), o país importou no período de 01/1996 a 12/2008 cerca de 22.500 toneladas destas galactomananas, com um gasto total de 51,35 milhões de dólares. Dessa forma, a obtenção de novas fontes desse biopolímero pode propiciar, futuramente, um aproveitamento dessa matéria-prima, assim como incentivar uma maior exploração desse nicho de mercado. Assim, de acordo com a revisão bibliográfica apresentada, as ausências de dados referentes à composição do polissacarídeo do endosperma das sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* (pau-ferro), de suas propriedades em solução, bem como de seus derivados aniônicos e anfífilos gerados quimicamente trazem a premissa de que a caracterização da galactomanana dessa espécie nativa pode constituir mais uma fonte alternativa da goma e justificam o presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral extrair e caracterizar o polissacarídeo, uma galactomana, do endosperma da semente da *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* e gerar a partir dele derivados aniônicos e anfílicos avaliando suas características estruturais e propriedades físico-químicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com o intuito de atingir o objetivo geral, este trabalho tem como objetivos específicos as seguintes etapas:

- Isolar e caracterizar o polissacarídeo das sementes da *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*;
- Analisar a estrutura fina desse polissacarídeo a partir de derivados acetilados e acetilados parcialmente metilados por cromatografia em fase gasosa acoplada ou não a espectrômetro de massa (GC-MS e GC respectivamente);
- Avaliar por ressonância magnética nuclear do Hidrogênio (^1H), do Carbono (^{13}C) e de correlações ^1H – ^1H vicinais (COSY) e ^{13}C – ^1H (HMQC) as características estruturais desse polissacarídeo;
- Modificar o polissacarídeo das sementes da *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* por métodos químicos via oxidação parcial e N-alquilação/oxidação;
- Caracterizar os derivados obtidos via oxidação e N-alquilação/oxidação através de análises de infravermelho (FTIR) e ^{13}C -RMN;
- Avaliar os parâmetros físico-químicos assim como a massa molar do polissacarídeo de sementes da *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* e seus derivados por cromatografia de permeação em gel (GPC);
- Avaliar o comportamento em solução do polissacarídeo de sementes da *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* e seus derivados, analisando o efeito das cargas geradas pela oxidação e N-alquilação/oxidação por espectroscopia de fluorescência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO

As sementes *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* foram fornecidas pela Agropecuária Santa Helena Com. Emp. Ltda – Projeto Matas Nativas, município de Itatinga, estado de São Paulo. O polissacarídeo foi obtido no laboratório de Biopolímeros (DQUI/UFPR) através do processo da extração aquosa, de acordo com o procedimento descrito a seguir.

Primeiramente, 50 g de sementes foram descascadas e o endosperma foi moído em liquidificador comercial, sendo posteriormente colocado em sohxlet sob refluxo com éter etílico a 40°C, para a inativação enzimática, deslipidificação e despigmentação. O resíduo, após secagem à temperatura ambiente ($\pm 22^\circ\text{C}$), foi submetido a uma extração aquosa a 25°C, novamente em liquidificador. O processo foi repetido várias vezes, as fases aquosas foram reunidas e os resíduos foram separados através de centrifugação a 6311,2 g por 40 min, utilizando centrífuga modelo SIGMA com rotor de 11,5 cm de raio.

O sobrenadante obtido foi concentrado em rota-evaporador sob pressão reduzida e temperatura de 40°C. Uma quantidade de NaCl foi acrescentada à solução para se obter uma concentração de 0,1 mol/L e, então, o polissacarídeo foi precipitado com 2 volumes de etanol hidratado industrial 93,2° INPM. O precipitado foi filtrado em pano e seco a 25°C, obtendo-se assim o polissacarídeo nativo (amostra GMPF). Para o estudo da estrutura fina do carboidrato, o material foi solubilizado em água destilada, filtrado em membrana de 0,22 μm e, posteriormente, precipitado com etanol e seco (amostra GMPFP).

Para comparação dos estudos relativos ao polissacarídeo extraído, foi utilizada uma galactomanana sem nenhum tratamento prévio comercializada pela Indian Gum Limited - B-5/7. M.I.A., Basni, Phase-Ist, Jodhpur-342005, Índia. Essa foi fornecida como doação pela empresa Herbarium S.A. (goma Guar, amostra GG). O fluxograma da FIGURA 20 mostra, de forma resumida, o procedimento de extração da amostra GMPF.

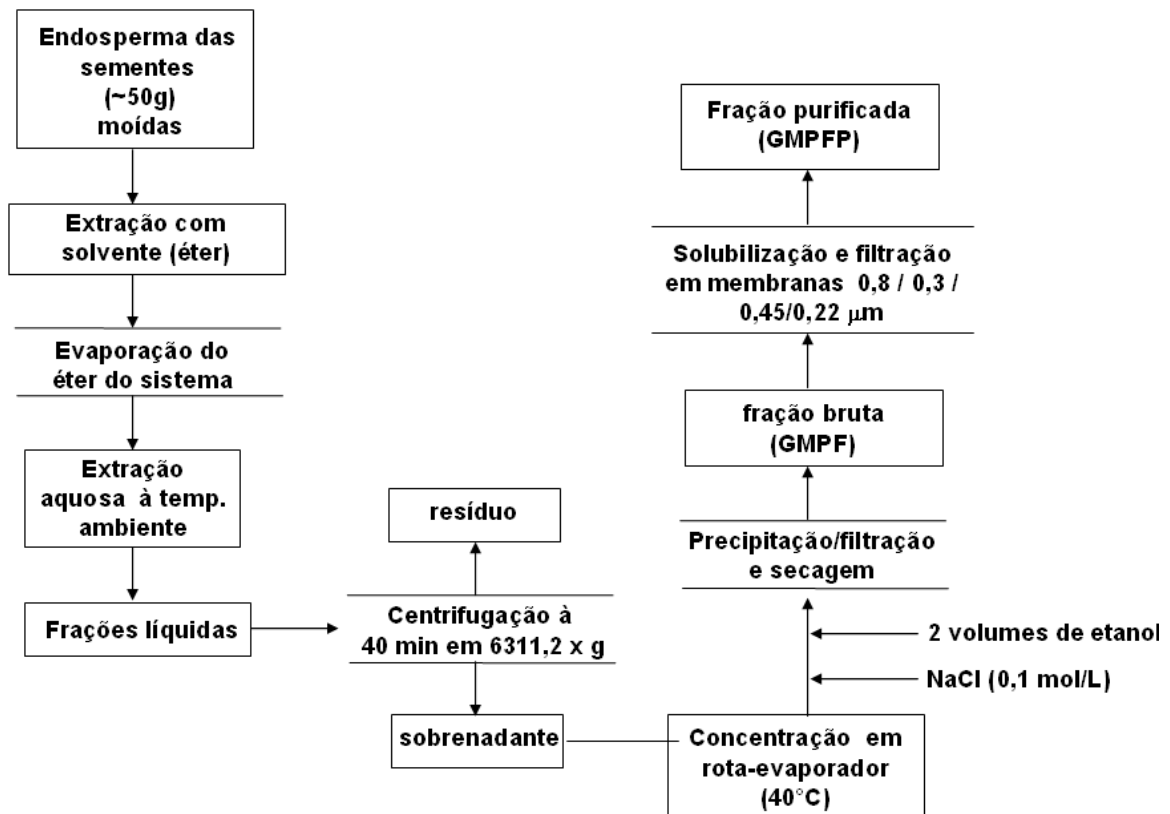


FIGURA 20 – PROCEDIMENTO VIA EXTRAÇÃO AQUOSA DO POLISSACARÍDEO DAS SEMENTES DA *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*

4.2 ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO BRUTA E PURIFICADA (GMPF E GMPFP)

4.2.1 Determinação de carboidrato total, proteína, umidade, massa residual e estabilidade térmica

O carboidrato total foi estimado pelo método fenol-sulfúrico, utilizando como padrão a glucose (SIGMA®) em solução aquosa na faixa de concentração de 10 a 100 µg/mL e as leituras em comprimento de onda de 490 nm (DUBOIS *et al.*, 1956).

Para a dosagem de proteína foi utilizada solução aquosa de albumina de soro bovino (BSA, SIGMA®) como padrão. A curva de calibração (50 a 200 µg/mL) foi construída utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (MERCK®), com leituras em comprimento de onda de 650 nm (HARTREE, 1972).

Para as leituras foi utilizado um espectrofotômetro BIOSPECTRO modelo SSP – 220 utilizando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

Para determinar o teor de massa residual e umidade, os materiais (amostras GMPF, GMPFP e GG) foram dialisados, liofilizados e mantidos a 20°C e umidade de 40% num período de uma semana, para posterior análise termogravimétrica. Cerca de 10 mg de amostra foi acondicionada em cadinho de alumina (Al_2O_3), o qual foi levado ao equipamento METLER-TOLEDO TGA/SDTA851 (LAMIR/UFPR) em varredura de temperatura na faixa de 30-700°C, taxa de aquecimento de 10°C/min em fluxo de oxigênio (O_2). Através do perfil dos termogramas (perda de massa) obtidos na análise avaliou-se também a estabilidade térmica entre as amostras.

4.3 ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO PURIFICADA (AMOSTRA GMPFP)

4.3.1 Determinação da composição monossacarídica, através dos derivados acetilados, por cromatografia em fase gasosa (GC)

Para verificar a composição monossacarídica foi utilizado o método de WOLFROM e THOMPSON (1963 a, b) sendo seguidas as seguintes etapas:

a. Hidrólise do polissacarídeo

Hidrólise ácida total, de 10 mg de amostra, com ácido trifluoracético 1 mol/L, durante 5 horas, em banho de água a 96°C. O ácido residual foi evaporado em rotaevaporador (QUIMIS) e as amostras lavadas várias vezes com água (ADAMS, 1965).

b. Redução, acetilação e análise por cromatografia em fase gasosa (GC)

Os monossacarídeos obtidos após hidrólise ácida e em solução foram convertidos, com boroidreto de sódio (NaBH_4), de aldeídos a álcool, incubados por 12 horas, à temperatura de 50°C. Os íons Na^+ foram removidos com resina Lewatit S-100 catiônica (H^+), o ácido bórico foi eliminado por co-destilação com metanol (3 x 5 mL) em rotaevaporador na forma de éster volátil, o borato de trimetila. Os alditóis

foram, então, submetidos à acetilação com anidrido acético em presença de piridina como catalisador (1:1 v/v), à 25°C, por 18 horas. Após esse período, o processo foi interrompido pela adição de gelo moído, quando ocorreu formação de ácido acético, a partir do anidrido acético presente em excesso. Os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio (5 mL), e a piridina foi eliminada através de tratamentos sucessivos com solução a 5% de CuSO_4 quando houve a formação de sal de piridina (WOLFROM e THOMPSON, 1963a, b).

Os monossacarídeos convertidos em acetato de alditóis foram analisados por cromatografia em fase gasosa (GC) em cromatógrafo HEWLETT PACKARD, modelo 5890 A, série II, à temperatura de injeção de 220°C, com coluna J & W Scientific, modelo DB-225 (0,25 mm d.i. x 30 m), tendo nitrogênio como gás de arraste (2 mL/min) (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR). Através da integração dos picos foi obtido o percentual molar das unidades monossacarídicas presentes, e foi calculada, também, a relação Man/Gal para a amostra GMPFP.

4.3.2 Identificação das ligações glicosídicas do polissacarídeo, a partir de derivados de acetatos de alditóis parcialmente metilados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectro de massas (GC-MS)

A fração purificada (amostra GMPFP) foi metilada de acordo com o método de CIUCANU e KEREK (1984). A solubilização de 20 mg de amostra ocorreu em DMSO a 40°C (1 mL para cada 10 mg de polissacarídeo), em seguida foi adicionado 0,5 mL de iodeto de metila. Após a homogeneização 30 mg de NaOH seco e pulverizado foi adicionado aos poucos sob agitação mecânica vigorosa de 30 minutos até a solidificação do sistema, sendo mantido em repouso por 24 h. Esse processo (adição de iodeto de metila e NaOH) foi repetido por mais 2 vezes completando-se assim a etapa de metilação. A cada etapa, as frações foram neutralizadas com ácido acético glacial, dialisadas e liofilizadas.

Após a etapa final de metilação, as amostras foram hidrolisadas com H_2SO_4 72% (m/v), reduzidas com boroidreto de sódio deuterado, acetiladas (conforme item

b do procedimento 4.3.1) e analisadas em cromatógrafo em fase gasosa (GC-MS) modelo VARIAN 3300, acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN “*Ion-Trap*” (modelo 810 R-12). Para tal foi utilizado uma coluna capilar OV-225, temperatura constante de 220°C e hélio como gás de arraste (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR). Os derivados foram analisados na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados e os tipos de ligação foram determinados através das fragmentações específicas obtidas pela análise no espectrômetro de massa.

4.3.3 Análise dos polissacarídeos por cromatografia de permeação em gel (GPC) – determinação da distribuição das massas molares (M_n , M_w), tamanho molecular (R_h e R_g), viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e homogeneidade

Para a determinação dos parâmetros citados, primeiramente foi determinado o incremento do índice de refração (dn/dc), a partir de soluções da goma Guar (GG) e da GMPF, na faixa de 0,2 a 1,0 mg/mL em solução de nitrato de sódio 0,1 mol/L contendo 200 ppm de azida de sódio. As amostras foram filtradas em membranas de 0,45 μm e 0,22 μm , antes da injeção. O valor de dn/dc foi obtido pela extrapolação dos valores da área do pico de índice de refração em função da concentração, através de uma regressão linear obteve-se esse valor. As medidas foram efetuadas em refratômetro VISCOTEK (Malvern Co., Estados Unidos), modelo VE3580.

Seqüencialmente ao cálculo do dn/dc , as soluções aquosas dos polissacarídeos, GG, GMPF, GMPFOXT e GMPFOXD, numa concentração de 1,0 mg/ml em nitrato de sódio 0,1 mol/L contendo 200 ppm de azida de sódio, foram filtradas em membranas 0,45 μm (Millipore).

Foram injetados 100 μL de solução da amostra ao GPC contendo colunas de polimetacrilato PWxl (Tosoh, Japão) 6000, 4000 e 2500 conectadas em série com limites de exclusão de 8×10^6 , 3×10^5 e 3×10^3 g/mol, respectivamente; e acopladas a um refratômetro diferencial VISCOTEK, modelo VE3580, e um detector de espalhamento de luz laser, modelo 270 Dual Detector (VISCOTEK), baixo ângulo, a 7° (LALLS, do inglês *Low Angle Laser Light Scattering*) e ângulo reto, a 90° (RALLS,

do inglês *Right Angle Laser Light Scattering*) à 632,8 nm; como eluente foi utilizado o mesmo solvente da solução das amostras.

Para a calibração do equipamento foram utilizados padrões cromatográficos de massa conhecida, o poli(óxido de etileno) (22×10^3 g/mol) e a dextrana (70×10^3 g/mol) de procedência da VISCOTEK, preparada previamente na mesma solução das amostras. A compilação dos resultados obtidos pelos detectores foi realizada em Software OmniSec (VISCOTEK).

4.4 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO BRUTA (GMPF) EXTRAÍDA DE SEMENTES DE *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* (AMOSTRA GMPF)

4.4.1 Modificação química via oxidação

A reação de oxidação seguiu o procedimento descrito em NOOY *et al.* (1994, 1995, 1996); SIERAKOWSKI *et al.* (2000); BRAGD *et al.* (2000).

Para a oxidação, 1,5 g da fração bruta (amostra GMPF) foram solubilizadas em 1L de água destilada sob agitação mecânica controlada a 10000 rpm (15 min). Após, o material foi mantido sob agitação por 24 h e aquecimento de 30°C.

A solução resultante foi levada para a reação numa temperatura de 3°C em presença de nitrogênio gasoso (N_2). Ao meio reacional foram adicionados 10,71 mL de solução hipoclorito de sódio (NaOCl, BOND-CARNEIRO) a 10% (m/v), equivalente a 14,36 mmol de NaOCl. Em seguida, 115 mg (1,11 mmol) de NaBr (MERCK®) foi adicionado, e o pH foi ajustado para 9,3 utilizando uma solução de HCl 1mol/L. Após ajuste, 23 mg (0,149 mmol) de N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) (SIGMA®). A reação de oxidação foi controlada pela adição de solução aquosa de NaOH (0,05 mol/L) por 4 h. Para interromper a reação foram adicionados aproximadamente 20 mL de etanol (MERCK®) e 30 mg (1,95 mmol) de $NaBH_4$ (MERCK®). Após 45 min o pH foi ajustado para 8 e o material precipitado com 2 volumes de etanol hidratado industrial 93,2° INPM. O derivado precipitado foi denominado de GMPFOXT.

A conversão do álcool em ácido foi estimada por titulação utilizando um potenciômetro de bancada (CORNING 320) com solução aquosa de NaOH (0,05 mol/L) durante o processo de oxidação. A formação dos grupos carboxila corresponde, dessa forma, a quantidade de NaOH utilizado no processo titulométrico (NOOY *et al.*, 1994 e 1995). O grau de oxidação (GO) que indica a razão entre a concentração em mmoles oxidados e a concentração em mmoles oxidáveis (unidades que apresentam CH₂OH livres) foi calculado através da medida de consumo de solução aquosa de NaOH (0,05 mol/L) durante a reação de oxidação.

4.4.2 Modificação química por N-alquilação e oxidação

Para a modificação por N-alquilação e oxidação foi aplicado o procedimento semelhante ao da oxidação descrito por NOOY *et al.* (1994, 1995, 1996), SIERAKOWSKI *et al.* (2000) e BRAGD *et al.* (2000), com algumas modificações.

A fração bruta GMPF (1,5 g) foi solubilizada em 1L de água destilada sob agitação mecânica controlada a 10000 rpm (15 min). Após o material foi levado ao agitador magnético e mantido sob agitação por 24 h e aquecimento de 30°C.

Em temperatura de 25°C foram adicionados à solução de GMPF, 10,71 mL de uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl, BOND-CARNEIRO) 10 % (m/v), equivalente a 14,36 mmol de NaOCl. Para estabilizar o pH em 9,3, utilizaram-se gotas de uma solução aquosa de HCl 1 mol/L. Após o ajuste, 23 mg (0,149 mmol) de N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) (SIGMA®) foi adicionado ao sistema. No início da reação foram acrescentados 107,3 mg (0,58 mmol) de dodecilamina (SIGMA®) para a reação de N-alquilação, e 87 mg (1,734 mmol) cianoborohidreto de sódio (MERCK®) como agente redutor.

Controlou-se o pH alcalino com uma solução aquosa de NaOH (0,05 mol/L) por 4 horas, para gerar após a N-alquilação grupos carboxilados, nas hidroxilas oxidáveis restantes, pelo reagente TEMPO conforme descrito no item 4.4.1. Para interromper o processo, 30 mg de NaBH₄ foram acrescentados e a solução foi agitada por mais 1 hora. O pH foi ajustado para 8 com solução aquosa de HCl 1 mol/L, e o derivado precipitado com 2 volumes de etanol industrial (93,2° INPM), e seco a 25°C (SIERAKOWSKI *et al.*, 2000), que foi denominado de GMPFOXID.

O grau de conversão de álcool à carboxila após N-alquilação, também, foi estimado por titulação utilizando um potenciômetro de bancada (Corning 320), de acordo como descrito no item 4.4.1.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA EXTRAÍDA DE SEMENTES DE *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* (GMPF) E DOS DERIVADOS GMPFOXT E N-GMPFOXD POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para as análises por FTIR foram obtidas pastilhas com 100 mg de KBr (MERCK®) seco e 2 mg (base seca) da GMPF e dos derivados GMPFOXT e GMPFOXD. A mistura de KBr e das amostras foram homogeneizadas utilizando pistilo e almofariz, levadas a uma prensa hidráulica manual (DQUI-UFPR) e submetida a pressão de aproximadamente 8 ton por 5 min.

As análises foram realizadas utilizando um Espectrofotômetro de Infravermelho modelo BIORAD Excalibur – FTIR (DQUI-UFPR) com 4 cm⁻¹ de resolução e transformada de Fourier. Os espectros foram obtidos na região de 4000-400 cm⁻¹ em transmitância T (%) e os dados tratados utilizando o programa Origin.

4.6 ANÁLISE ESTRUTURAL DA FRAÇÃO BRUTA (GMPF) E PURIFICADA (GMPFP) DE SEMENTES DE *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* E DE SEUS DERIVADOS (GMPFOXT E GMPFOXD) POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE HIDROGÊNIO (¹H) E CARBONO TREZE (¹³C)

4.6.1 Análise estrutural da galactomanana purificada (amostra GMPFP)

Para a fração purificada foram realizados experimentos mono (¹³C-RMN e ¹H-RMN) e bidimensionais de correlações homonuclear (COSY do inglês -

homonuclear COrelated SpectroscopY) e heteronuclear (HMQC do inglês - *Heteronuclear MultipleQuantum Correlation spectroscopy*).

Os hidrogênios da fração GMPFP foram previamente trocados por deutério, num procedimento de solubilização em D₂O e liofilização por três vezes. A GMPFP deuterada foi então solubilizada em D₂O numa concentração de 25 g/L, a temperatura de 40°C e mantida em agitação magnética por 12 h. A solução resultante foi centrifugada e o sobrenadante condicionado em tubo de vidro (5 mm) específico para RMN.

As análises de RMN mono e bidimensionais foram realizadas em espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE – DRX 400 (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR) acoplado a transformada de Fourier, com temperatura de análise de 70°C. Para a calibração dos espectros os deslocamentos da água (δ 4,7) e da acetona (δ 32,3) foram utilizados como padrão interno para ¹H e ¹³C, respectivamente, e a frequência de observação do núcleo foi de 100 MHz para ¹³C e 400 MHz para ¹H. Todos os parâmetros para as análises mono e bidimensionais foram fornecidos pelo software do próprio equipamento.

Os resultados da análise por RMN mono e bidimensional foram compilados pelo programa MestreC[®] e os dados obtidos serviram para determinar a razão Man/Gal, identificar os componentes das unidades monossacarídicas e a distribuição randômica da α -D-galactopiranosose ao longo da cadeia da β -D-manopiranosose.

4.6.2 Análise estrutural do material oxidado (GMPFOXT) e do material N-alquilado/oxidado (GMPFOXD)

Para a verificação dos grupos carboxílicos e dos grupos aminoalquila gerados na modificação química da GMPF, os derivados GMPFOXT e GMPFOXD foram solubilizados em água milli-Q num período de 24 h. Aos materiais solubilizados, 10% de D₂O foram adicionados para efeito de calibração do equipamento, sendo de 25 g/L a concentração final da solução de análise. As soluções foram condicionadas em tubos de 10 mm, usando a acetona como padrão

interno. A temperatura de análise dos derivados foi de 30°C. A frequência de observação do núcleo foi de 100 MHz para o ^{13}C .

4.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AGREGAÇÃO CRÍTICA (CAC) DA GALACTOMANANA DE *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* (GMPF) E SEUS DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD) POR FLUORESCÊNCIA

Para analisar o efeito das modificações químicas efetuadas na galactomana da *C. ferrea* var. *ferrea* (amostra GMPF) foram realizadas análises de fluorescência das amostras oxidada (GMPFOXT) e N-alquilada/oxidada (GMPFOXD) em soluções aquosas e comparadas com o material bruto (GMPF).

As amostras foram solubilizadas em solução aquosa de nitrato de sódio 0,1 mol/L contendo 200 ppm de azida de sódio por 24 horas, obtendo uma solução de concentração a 2 mg/mL. A partir dessa foram preparadas soluções diluídas entre 2 mg/mL e 0,01 mg/mL, para a extrapolação do gráfico. Após, sob agitação, adicionou-se 0,005 mL de uma solução de pireno em metanol (1,2 mg de pireno/5 mL de metanol), e as soluções ficaram em repouso por 30 min antes da análise.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de fluorescência HITACHI – F4500 (DQUI/UFPR) em cubeta de quartzo, com varredura de 360 até 500 nm, obtendo os espectros de fluorescência no modo de emissão em relação ao pireno. A determinação da concentração de agregação crítica (CAC) foi obtida pela extrapolação do gráfico da razão da intensidade do pico III (383,2 nm) pelo pico I (372,8 nm) do espectro de fluorescência em relação ao logaritmo da concentração das soluções dos polissacarídeos (AMIJI, 1995).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA (GMPF) EXTRAÍDA DA SEMENTE DE *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*

Os resultados referentes ao material obtido da extração das sementes da *C. ferrea* var. *ferrea* (GMPF), o material purificado (GMPFP) e a galactomanana de Guar (GG) estão apresentados na TABELA 1.

TABELA 1 – RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO EM PORCENTAGEM (m/m) EM TERMOS DE MASSA RESIDUAL, UMIDADE, PROTEÍNA E CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO BRUTA (GMPF) EXTRAÍDAS DE SEMENTES DA *C. ferrea* var. *ferrea*, E RENDIMENTOS EM RELAÇÃO A GOMA GUAR (GG)

Material	Rendimento	Massa residual **	Umidade**	Proteína ²	Açúcar total ³
GMPF	33,4 ¹	3,8 (4,9)	12,6 (11,5)	24,8	65,4
GMPFP*	13,4	2,7	14,7	9,0	75,0
GG	19-43 ⁵	0,8	13,6	8,5	81,0

¹ Obtido a partir de sementes totais

³ Método de DUBOIS *et al.* (1956)

² Método de Hartree (HARTREE, 1972)

⁵ WHISTLER e BeMILLER (1993)

* Galactomanana purificada em membrana millipore® de 0,22 µm

** Resultados obtidos através de análise termogravimétrica (TGA/DTA); valor em parênteses referente ao material não dialisado

Observou-se que o rendimento da GMPF em relação às sementes totais pode ser considerado alto quando comparado com os dados da literatura, a saber: para as galactomananas de *Mimosa scabrella* (30%) (GANTER, 1988), *Stryphnodendron barbatiman* (16,4%) (LEITNER, 1991), *Cassia fastuosa* (27%) (TAVARES, 1994), *Mimosa pseudincana* (27%), *Apuleia leiocarpa* (23%) e *Mimosa regnellii* (23%) (LUCYSZYN, 1994). *Senna multijuga* (23%) (VARGAS-RECHIA *et al.*, 1995). Anteriormente, WHISTLER e BeMILLER (1993) obtiveram, respectivamente, 19 e 43% de rendimento para a fonte comercial *Cyamopsis tetragonolobus*.

A GMPF apresentou um valor bastante alto de proteína, em torno de 25 %. Valores acima da média foram obtidos por LUCYSZYN (2004) para a galactomanana de *Leucena leucocephala* (30 %) e por KAPPOR; BANEIJI e PRAKASH (1992) para outras como *Acacia catechu*, *Cassia occidentalis* e *Dalbergia sissoo*, onde as porcentagens foram de 39,6, 30,9 e 55,9 %, respectivamente. O material bruto purificado por filtração em membrana millipore (GMPFP) teve teores de proteínas semelhantes aos obtidos para as galactomananas de *Cyamopsis tetragonolobus* por HERALD (1986a), *C. fastuosa* (TAVARES, 1994), *Mimosa scabrella* (GANTER, 1988), *Stryphnodendron barbatiman* (LEITNER, 1991) e *Schizolobium amazonicum* (PETKOWICZ, 1993).

Em relação à GMPFP, a qual foi gerada pelo processo de purificação por membrana, houve uma diminuição do teor de proteínas, porém o baixo rendimento (40 %), obtida a partir da GMPF bruta, não favorece esse procedimento. O material purificado foi utilizado apenas nas etapas de caracterização da estrutura fina do polissacarídeo extraído da *C. ferrea* var. *ferrea*.

Pelas análises termogravimétricas dos materiais bruto (GG e GMPF) e purificado (GMPFP) foi possível verificar o teor de umidade, cinzas e estabilidade térmica da base seca desses polissacarídeos. Os termogramas resultantes da análise térmica encontram-se na FIGURA 21.

Após verificação de uma grande quantidade massa residual presente no material não purificado (GMPF, 4,9%) (FIGURA 21, ●●●), todos os materiais foram submetidos a um processo de diálise em que, pelo processo de extração efetuado para a obtenção do polissacarídeo, um possível excesso de sal pode ter sido utilizado para a precipitação. Após o processo de diálise, verificou-se uma perda acentuada de massa para os polissacarídeos e conseqüente diminuição no teor de cinzas para 3,8% para GMPF (TABELA 1 e FIGURA 21, – ■ –), indicando que o procedimento foi eficiente para a remoção de sal.

Avaliando os termogramas observa-se que a GMPF (●●●), GMPFP (●●●●) e GG (—) apresentam três eventos, sendo mais evidente no material não dialisado. O primeiro (30→110°C) é relacionado a perda de água de hidratação, podendo esse ser considerado o teor de umidade das amostras. Os valores de umidade obtidos para a GMPF (12,6% e 11,5%), GMPFP (14,7%) e GG (13,6%), estão de acordo com os encontrados na literatura para galactomananas. Os teores relatados para

umidade em amostras comerciais, segundo AZERO e ANDRADE (2002), foram na faixa de 9 a 8%. Para galactomananas de goma Locusta, DAKIA *et al.* (2007) obteve valores de 6% e CUNHA *et al.* (2007) entre 11 e 14% para a goma Guar.

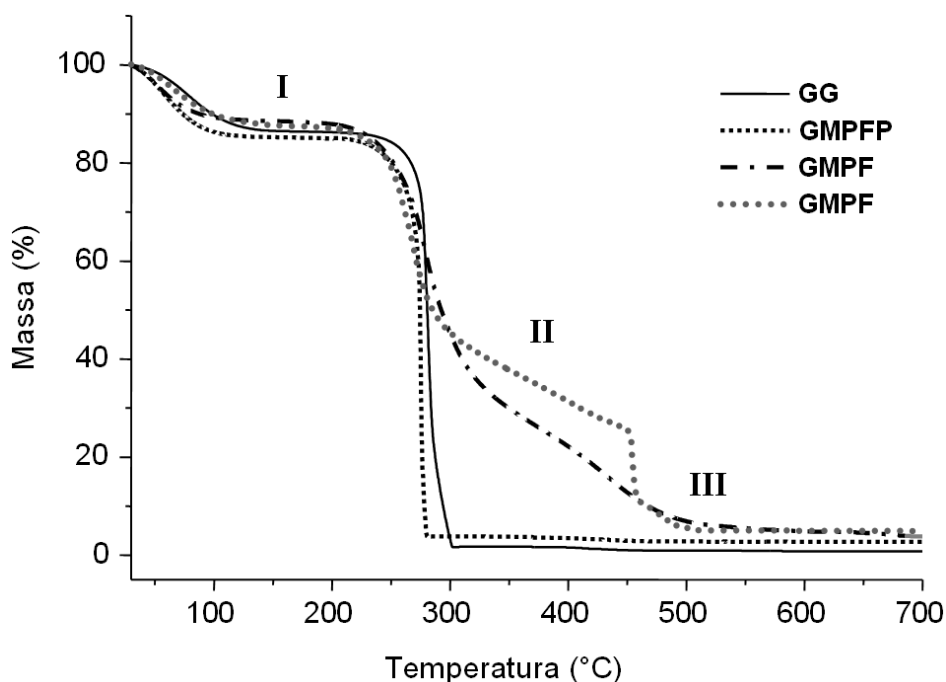


FIGURA 21 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*

LEG.: GMPF ANTES (●●●●) E APÓS DIÁLISE (— ■ —), GMPF PURIFICADA (GMPFP,....) E GALACTOMANANA DE GUAR (GG,—) APÓS DIÁLISE. OS NÚMEROS EM ROMANO INDICAM OS EVENTOS QUE OCORREM NO PROCESSO DEGRADATIVO. TX AQUEC. 10°C/min, VARREDURA: 30-700°C EM O₂

O segundo evento (II) indicou o processo de queima da matéria orgânica, sendo observado nas amostras GG e GMPFP com maior intensidade, onde foram destruídos mais de 90% do material. Os termogramas para os materiais indicaram similaridade na composição dos polissacarídeos, como o observado nos resultados da TABELA 1. O polissacarídeo de Pau-ferro bruto sem diálise GMPF (FIGURA 21, ●●●●) apresentou um processo de combustão mais lento, perdendo até o evento II aproximadamente 50% massa, que pode ser atribuída a alguns contaminantes presentes após precipitação, como resíduos da casca e alto teor de sal, conforme discutido anteriormente. Perfis de degradação térmica antes e após purificação da

goma Guar (GG) foram observados por CUNHA *et al.* (2007) e a estabilidade da GG por VARMA (1996) mostrou o mesmo comportamento de degradação nessa faixa de temperatura.

O terceiro evento (III), mais acentuado na amostra não dialisada, estaria relacionado à matéria orgânica mais resistente a degradação, como fibras e outros resíduos da casca, deslocando a degradação do material para temperaturas mais elevadas. Nos materiais dialisados esse evento é baixo para GG e GMPFP; sendo que para a GMPF após diálise esse evento foi atenuado, mostrando a influencia do sal no processo degradativo do polissacarídeo.

Segundo CUNHA *et al.* (2007) e VARMA (1996), o evento exotérmico proveniente da queima da matéria orgânica ocorreu entre 300-400°C, e a massa restante foi considerada como cinzas e os resultados obtidos no presente trabalho após diálise, a saber GMPF (3,8%), GMPFP (2,7%) e GG (0,7%), estão em acordo com os teores obtidos por WANG *et al.* (2003), SITTIKIYOTHIN *et al.* (2005) e CUNHA *et al.* (2007) para a galactomanana de Guar que foram relatados estarem na faixa de 0,5-4%. Dessa forma, os resultados obtidos por termogravimetria podem ser utilizados como controle na determinação da pureza do polissacarídeo, assim como uma alternativa para determinação de umidade e teor de cinzas utilizando uma pequena quantidade de amostra.

5.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO POLISSACARÍDEO PURIFICADO (GMPFP), ATRAVÉS DOS DERIVADOS ACETILADOS, POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (GC)

Para a determinação da composição monossacarídica do polissacarídeo extraído das sementes da *C. ferrea* var. *ferrea*, o material foi primeiramente submetido a uma hidrólise ácida utilizando o ácido trifluoracético (TFA), um ácido forte conforme de WOLFROM E THOMPSON (1963) e posterior derivatização das unidades monossacarídicas que compunham a GMPFP.

O resultado da GC dos acetatos de alditóis foi obtido na forma de cromatograma referente às unidades monossacarídicas presentes na estrutura do

polissacarídeo (amostra GMPFP). O perfil cromatográfico, em unidades de área (mAU) versus tempo de retenção, encontra-se na FIGURA 22.

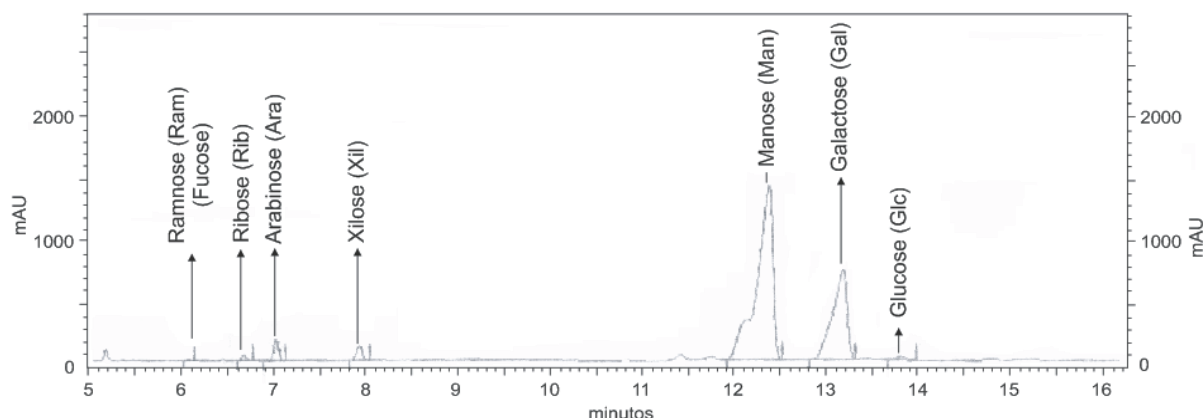


FIGURA 22 – CROMATOGRAMA RESULTANTE DA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (GC) EM COLUNA DB-225, À 220°C, DOS ACETATOS DE ALDITÓIS DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DAS SEMENTES DE *C. ferrea* var. *ferrea* (AMOSTRA GMPFP)

Calculando a área dos picos referentes a cada uma das unidades detectadas foram obtidos os teores em porcentagem em massa (% m/m) dos acetatos de alditóis. Na TABELA 2 encontram-se os resultados da análise da GMPFP e, os valores da literatura para a galactomanana de guar (GG) extraída da planta *Cyamopsis tetragonolobus*, para efeito comparativo.

TABELA 2 - COMPOSIÇÕES MONOSSACARÍDICAS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (GC) DOS POLISSACARÍDEOS DE SEMENTES DE *C.ferrea* var. *ferrea* (GMPFP) E DE GOMA GUAR (GG)

Amostra	Composição monossacarídica (% m/m) ^a						
	Ara	Glc	Man	Gal	Xil	Ram	Man/Gal
GMPFP ^b	3,1	0,9	64,2	30,2	2,5	0,1	2,1
GG ^c	1,8-4,4	3,1	58,3-58,5	34,2-35,2	0-0,9	0-0,5	1,70-1,66

Legenda: Ara– arabinose, Glc – glucose, Man – manose, Gal – galactose, Xil – xilose, Ram –ramnose

^a Percentual em massa (% m/m) obtida pela integração dos picos dos acetatos de alditóis

^b Por cromatografia gasosa (GC), como acetatos de alditóis, coluna DB-225, à 220°C.

^c Resultados obtidos por CUNHA *et al.*, 2005, 2009 e DEBON e TESTER, 2001.

Observaram-se altas concentrações em porcentagem em massa das unidades de manose (Man) (64,2%) e galactose (Gal) (30,2%) e, também, pequenas

quantidades de arabinose (Ara) (3,1 %), glucose (Glc) (0,9%), xilose (Xil) (2,2%) e ramnose (Ram) (0,1%); onde os constituintes minoritários podem estar relacionados com a presença de contaminantes de resíduos provenientes da casca.

Os altos teores de manose e galactose indicaram que o polissacarídeo extraído do endosperma da semente da *C. ferrea* var. *ferrea* realmente era uma galactomana; e a razão Man/Gal da GMPFP, obtida pela razão direta das concentrações em % (m/m), foi de 2,1, o qual mostrou que a cadeia de manose era altamente substituída. Pelo presente resultado, a razão Man/Gal foi próxima das obtidas por CUNHA *et al.* (2005, 2009) e DEBON & TESTER (2001) para a galactomanana de Guar (GG) extraída da planta *Cyamopsis tetragonolobus* com valores de 1,77 e 1,66 (ver FIGURA 3, pag. 26).

5.3. DETERMINAÇÃO DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS DO POLISSACARÍDEO PURIFICADO (GMPFP) A PARTIR DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS POR CROMATOGRAPHIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-MS)

Pelo método de CIUCANU e KEREK (1984) foram obtidos os derivados per-O-metilados, e que foram analisados por GC-MS. Pelas análises de GC-MS (dados não mostrados), as galactomananas de leguminosas possuem, geralmente, uma estrutura típica, variando apenas na ramificação e no grau de substituição na cadeia principal da β -D-Man pela α -D-Gal (SRIVASTAVA e KAPOOR, 2005).

As informações a respeito das ligações presentes do polissacarídeo purificado (GMPFP), obtidas para os derivados parcialmente metilados, encontram-se na TABELA 3, mostrando uma estrutura típica de polissacarídeos extraídos de leguminosas, conforme descrito por SRIVASTAVA e KAPOOR (2005). Assim, no processo de fragmentação da GMPFP metilada, foram observados predominantemente três tipos de derivados: o 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactose, o 2,3,6-trio-O-metil-D-manose e o 2,3-di-O-metil-D-manose. A presença do derivado 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactose indicou a substituição nas unidades de manose pela unidade terminal de galactose, e o derivado 2,3,6-tri-O-metil-D-manose indicou

regiões em que não há substituição na cadeia principal do polissacarídeo. Já a presença do derivado 2,3-di-O-metil-D-manose mostrou a presença das unidades de manose da cadeia principal substituídas pela galactose e a sua proporção indicou o grau de ramificação do polissacarídeo.

Dessa forma, a galactomanana extraída da semente da *C.ferrea* var. *ferrea* (amostra GMPFP) apresentou uma cadeia principal formada por unidades de D-manose ligadas 1→4 (69%) das quais 30% eram substituídas em O-6, por unidades terminais de D-galactose, e 39% não apresentaram substituição. A relação entre os derivados de manose e de galactose atribuiu uma relação Man/Gal de 2,3:1.

TABELA 3 – ANÁLISE POR METILAÇÃO DA GALACTOMANANA DE *C.ferrea* var. *ferrea* (GMPFP) NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS

O-metil alditol*	Ligação	Principais fragmentos (m/z)	Porcentagem molar (mol%)
2,3,4,6-Me ₄ -Man	Man _p (1→	87, 101, 117, 129, 145, 215	1
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Gal _p (1→	87,89,101,113,117,145,161,205	30
2,3,6 Me ₃ -Man	→4(Man _p)1→	87, 101, 117, 131, 143, 161, 173	39
2,3-Me ₂ -Man	→4)Man _p (1→ ↑ 6	87, 101, 117, 131, 143, 161, 173, 233	30

* Analisados em GC-HP5890 A SII, 220°C, em coluna DB225, gás de arraste: He₂ (2mL/min).

LEG.: Man_p – manopirranose; Gal_p – galactopirranose.

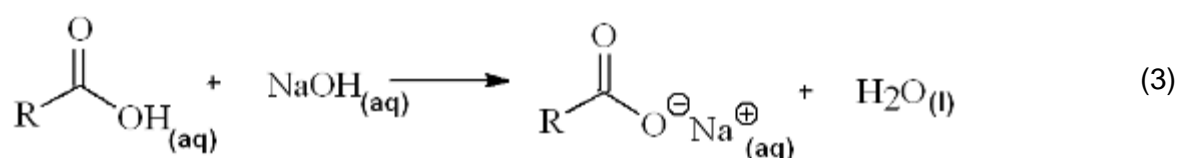
No entanto, considerando que a metilação é um processo degradativo, devido às condições drásticas de derivatização, os resultados podem gerar incertezas em função das reações químicas e da quantificação dos dados cromatográficos com erros na razão molar de mais de 10% (OMARSDOTTIR *et al.*, 2006). Portanto, a razão Man/Gal de 2,3 pode ser considerada como satisfatória, quando comparada a 2,1 que foi obtida com os derivados de acetato de alditóis.

Pela razão Man/Gal para a amostra GMPFP nota-se que essa possui uma estrutura, altamente substituída, semelhante à galactomanana extraída da Guar (GG), cuja razão varia de 1,3 a 2,0, segundo levantamento de SRIVASTAVA e KAPOOR (2005).

5.4 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA GALACTOMANANA DA *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* (AMOSTRA GMPF)

A modificação química via oxidação teve como objetivo gerar cargas negativas ao longo da cadeia do polissacarídeo, dando-lhe um caráter de eletrólito, diversificando e favorecendo sua utilização em sistemas em que se necessite estabilizar e interagir com compostos carregados.

No presente trabalho a modificação da galactomanana foi efetuada em meio básico conforme descrito por NOOY *et al.* (1994, 1995, 1996), SIERAKOWSKI *et al.* (2000) e BRAGD *et al.* (2000). Devido ao pH estar alcalino, a síntese do ácido carboxílico fez com que o pH fosse diminuindo ao longo do tempo. Para manter a seletividade da reação, o pH foi estabilizado utilizando uma base, ou seja, a solução aquosa de NaOH. Assim, o tempo de reação e o volume de NaOH adicionado ao meio reacional foram utilizados para controlar o processo de conversão do álcool primário a ácido, e assim se construiu o gráfico entre o volume de base e o tempo. E, como essa é uma reação de neutralização de estequiometria 1:1 (equação 3), pelo consumo de solução de base obteve-se o grau de formação de ácido.



Na primeira síntese foi realizada a oxidação total da galactomanana de *C. ferrea* var. *ferrea* (amostra GMPF) obtendo-se um polissacarídeo carregado, denominado GMPFOXT, no qual verificou-se o grau máximo de conversão do polímero em polieletrólito. O gráfico do consumo de solução de NaOH no processo de oxidação com o reagente TEMPO encontra-se na FIGURA 23.

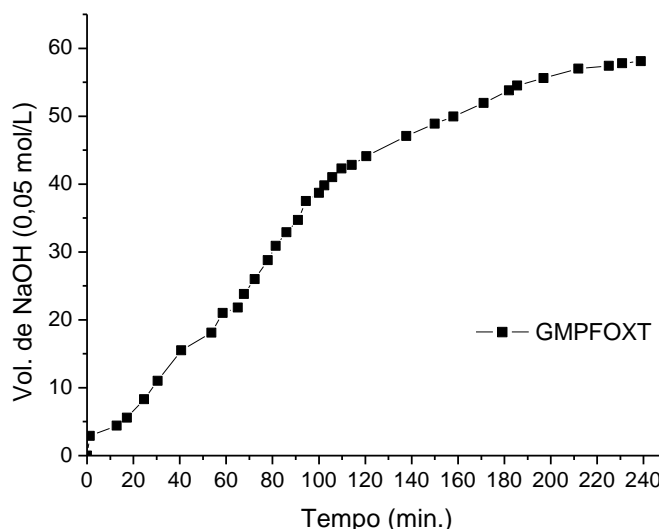


FIGURA 23 – CONSUMO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH (0,05 mol/L) DURANTE A OXIDAÇÃO DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea* PELA REAÇÃO COM O REAGENTE TEMPO (2,2,6,6,-TETRAMETILPIPERIDINA-1-OXIL); O PERFIL DA CURVA INDICA A CONVERSÃO DO ÁLCOOL A ÁCIDO CARBOXÍLICO

Seguindo o procedimento realizado por SIERAKOWSKI *et al.* (2000), utilizando o mesmo mecanismo de conversão do álcool ao intermediário aldeído, foi efetuada uma segunda síntese na qual a reação de oxidação se processou na ausência do brometo de sódio, e onde foi introduzido um composto aminoalquilado, a dodecilamina ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_2$), ao meio reacional. A dodecilamina utilizada encontrava-se na forma comercial de hidrocloreto de dodecilamina.

Essa etapa teve como objetivo inserir a aminoalquila em regiões específicas (C-6) do polissacarídeo, gerando o derivado anfifílico, denominado GMPFOXD. Isso foi possível devido à formação do intermediário aldeídico, mais reativo, que então se liga ao nitrogênio fazendo a ponte entre o polímero e a cadeia alifática da dodecilamina.

Após a reação de N-alquilação da galactomanana controlada pela quantidade de dodecilamina no meio reacional, seguiu-se a reação original de oxidação com a formação de ácidos em regiões de C-6 que não foram ligadas a dodecilamina. Esclarece-se que a reação ocorreu sem a presença de NaBr, o qual favorece a formação de ácidos. Assim, utilizou-se o intermediário aldeídico em presença do hipoclorito para a posterior reação de N-alquilação. Durante a síntese o

pH também foi controlado com solução NaOH 0,05 mol.L⁻¹ indicando também um menor consumo de base durante o tempo de reação, conforme visto na FIGURA 24.

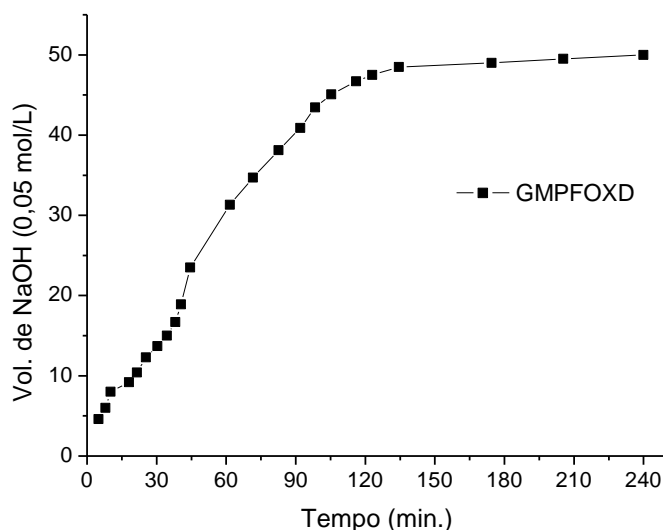


FIGURA 24 – CONSUMO DE NaOH (0,05 mol/L) DURANTE A N-ALQUILAÇÃO/OXIDAÇÃO DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea* PELA REAÇÃO COM REAGENTE TEMPO (2,2,6,6,-TETRAMETILPIPERIDINA-1-OXIL), O PERFIL DA CURVA INDICA A CONVERSÃO DO ÁLCOOL A ALDEÍDO E ESSE A N-ALQUIL OU A ÁCIDO CARBOXÍLICO GERANDO O DERIVADO FINAL GMPFOXD

O grau de oxidação (G.O.) foi calculado com base nas hidroxilas primárias livres presentes na galactomanana de acordo com a relação Man/Gal que indicaram que, a cada três unidades, duas na estrutura podem possuir OH primário. O volume da base consumido indicou, também, quantos mols de NaOH foram utilizados para neutralizar os grupamentos ácidos e, dessa forma, de acordo com a reação global de oxidação proposta por KATO *et al.* (2003) obteve-se por cálculo estequiométrico o G.O. (FIGURA 25).

De acordo com o procedimento de modificação descrito, baseando-se nos mecanismos de conversão dos álcoois primários para ácido carboxílico e inclusão do grupo aminoalquila (FIGURAS 8 e 9), as prováveis estruturas dos derivados GMPFOXT e GMPFOXD são propostas na FIGURA 26 e os rendimentos obtidos no final da reação encontram-se na TABELA 4.

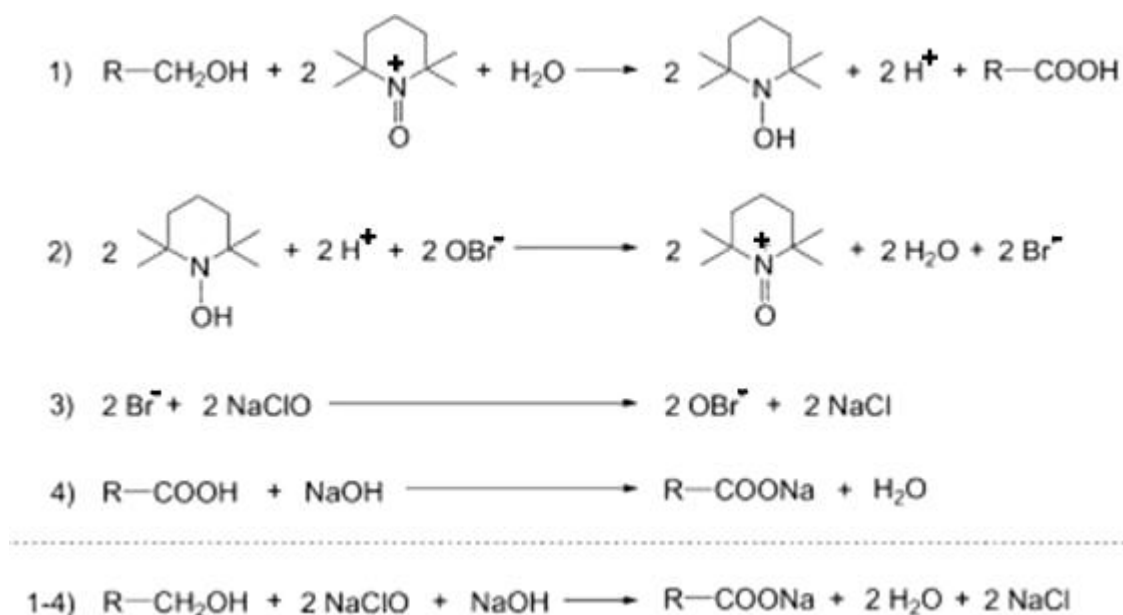


FIGURA 25 – SEMI-REAÇÕES E REAÇÃO GLOBAL PARA A CONVERSÃO DAS HIDROXILAS PRIMÁRIAS DO POLISSACARÍDEO A ÁCIDO PELA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO COM O REAGENTE TEMPO

FONTE: KATO *et al.* (2003)

Intermediário: $\text{R-CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{R-CHO}$

1ª síntese: $(1-x)\text{RCHO} \rightarrow (1-x)\text{RCOO}^-$ (GMPFOXT)

2ª síntese: $\text{R-CHO} + \text{R}'\text{-NH}_2 \rightarrow \text{R-CH}_2\text{-NH-R}'$ (GMPFOXD)

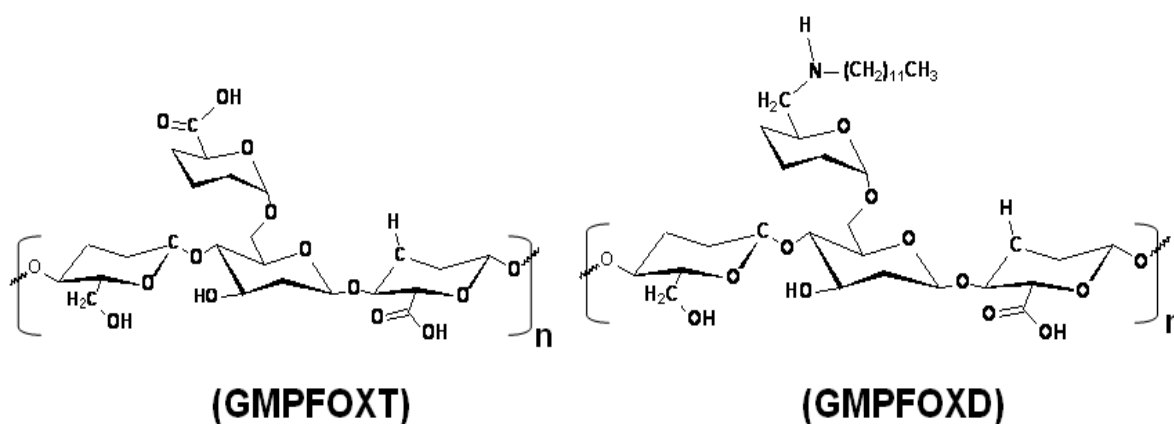


FIGURA 26 – SÍNTESE E ESTRUTURAS DOS DERIVADOS GERADOS POR MODIFICAÇÃO ESPECÍFICA DA GMPF COM O REAGENTE TEMPO

LEG.: GMPFOXT – oxidação; GMPFOXD – N-alkilação e oxidação

TABELA 4 – RENDIMENTO (% m/m) E GRAU DE CONVERSÃO (G.O., %) DOS DERIVADOS DA OXIDAÇÃO (GMPFOXT) E N-ALQUILAÇÃO/OXIDAÇÃO (GMPFOXD) DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea*

Derivados	GMPFOXT	GMPFOXD ¹
Rendimento(% m/m)	76,6	93,8
G.O. ² (%)	62,8	45,1

¹ Oxidação posterior à adição da dodecilamina.

² Valores obtidos pelo total de solução de NaOH consumida até o final da reação.

Os resultados obtidos mostraram, inicialmente, uma conversão parcial dos alcoóis primários a ácido, tanto para GMPFOXT (62,8 %) quanto para GMPFOXD (45,1%). O G.O. (%) para o derivado aminoalquilado foi mais baixo devido a formação de carboxilados em menor quantidade ao final da reação, pela introdução inicial da dodecilamina na estrutura da GMPF e, também, pela ausência de NaBr que diminuiu a velocidade de reação. Teoricamente, a quantidade de aminoalquila adicionada ao meio reacional foi calculada em aproximadamente 7% e a especificidade da modificação química foi confirmada por ressonância magnética nuclear do carbono treze (¹³C) e espectroscopia de na região do infravermelho (FTIR) nos itens 5.5.2 e 5.6, respectivamente.

5.5 ANÁLISE ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO DE *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* (GMPFP) E SEUS DERIVADOS (GMPFOXT E GMPFOXD) POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE HIDROGÊNIO (¹H) E DE CARBONO TREZE (¹³C)

5.5.1 Análise estrutural da galactomanana purificada (amostra GMPFP)

Pelas análises de RMN e de acordo com dados da literatura para a atribuição dos deslocamentos químicos, foi possível obter a relação Man/Gal a partir da integração na região anomérica dos espectros de hidrogênio e do carbono treze. Analisando o espectro de hidrogênio (¹H-RMN) (FIGURA 27), observaram-se sinais largos e sobrepostos na região entre δ 3,5 e δ 4,4, os quais dificultaram a atribuição

por esse espectro. Porém, em campo mais baixo, observaram-se dois deslocamentos bem resolvidos, um em δ 5,5 e outro em δ 5,2 referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos das unidades monossacarídicas de α -D-galactopirranose (A) e β -D-manopirranose (B), respectivamente. Pelos valores de integração obtidos pelo RMN do hidrogênio da GMPFP, a razão Man/Gal é de 2,1, e está similar aos resultados obtidos pela análise por cromatografia de fase gasosa dos acetatos de alditóis (2,1) e próxima a obtida pela análise dos materiais metilados (2,3) em cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas. Os valores da razão Man/Gal indicaram similaridade com a galactomanana comercial de *Cyamopsis tetragonoloba*, a qual apresentou valores entre 2 e 1,3, e também com as galactomananas de *Dimorphandra gardneriana*, razão de 1,9, estudada por CUNHA *et al.* (2009), *Crotalaria micans*, razão 2,1, estudada por BUCKERIDGE *et al.* (1995), *Leucaena leucocephala*, razão 1,9, estudada por SIERAKOWSKI *et al.* (2000).

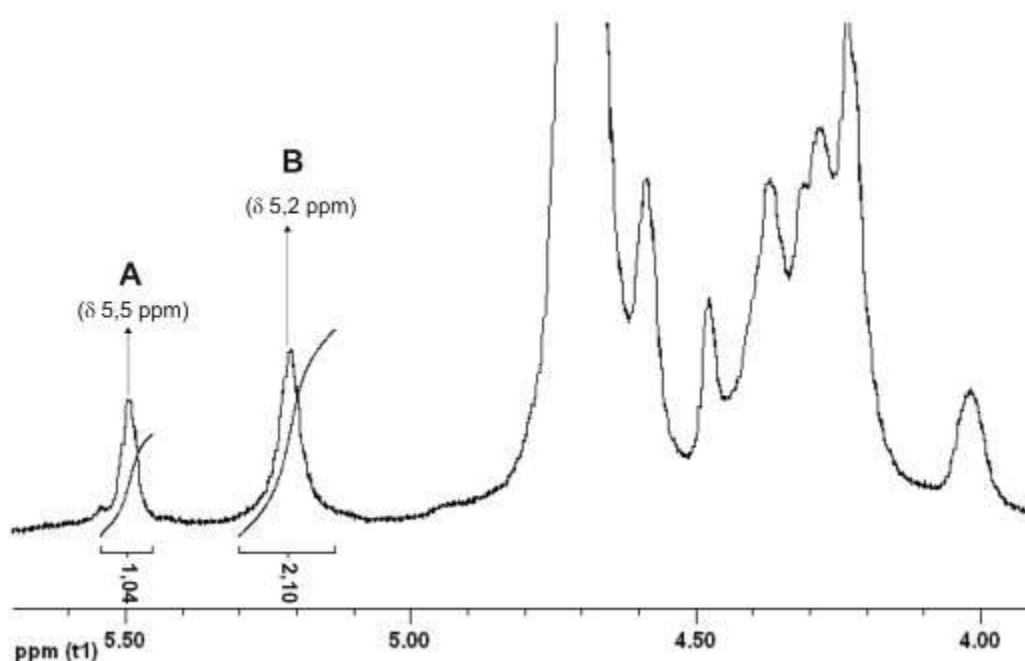


FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DO HIDROGÊNIO (¹H) DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea* (AMOSTRA GMPFP) E INTEGRAÇÃO NA REGIÃO ANOMÉRICA DO POLISSACARÍDEO PARA OBTENÇÃO DA RAZÃO MAN/GAL, SENDO (A) α -D-GALACTOPIRANOSE E (B) β -D-MANOPIRANOSE. ANÁLISE EM 400 MHz DE FREQUÊNCIA, EM D₂O, A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ)

O espectro de ^{13}C -RMN da GMPFP encontra-se na FIGURA 28. A resolução do espectro permitiu visualizar as regiões específicas dos carbonos anoméricos (entre δ 102-99) referentes a α -D-galactopiranosose (C-1) e β -D-manopiranosose (C-1) para campo mais baixo, dos carbonos substituídos e não substituídos (entre δ 68 – 80) e regiões do C-6 da Gal (δ 61,7) e da Man substituídos (δ 67,1) e não substituídos (δ 61,2) para campo mais alto.

A região do carbono anomérico do ^{13}C -RMN também permitiu obter a relação Man/Gal através da integração dos C-1 de Man e de Gal. Porém, a relação sinal/ruído no espectro de RMN do carbono treze (FIGURA 29 A) em polissacarídeos dificulta essa determinação de forma quantitativa. Através do software MestreC (v.4.7) foi efetuada a deconvolução e a construção dos deslocamentos referente a região de C-1 das unidades de Man e Gal. O espectro gerado encontra-se na FIGURA 29 B.

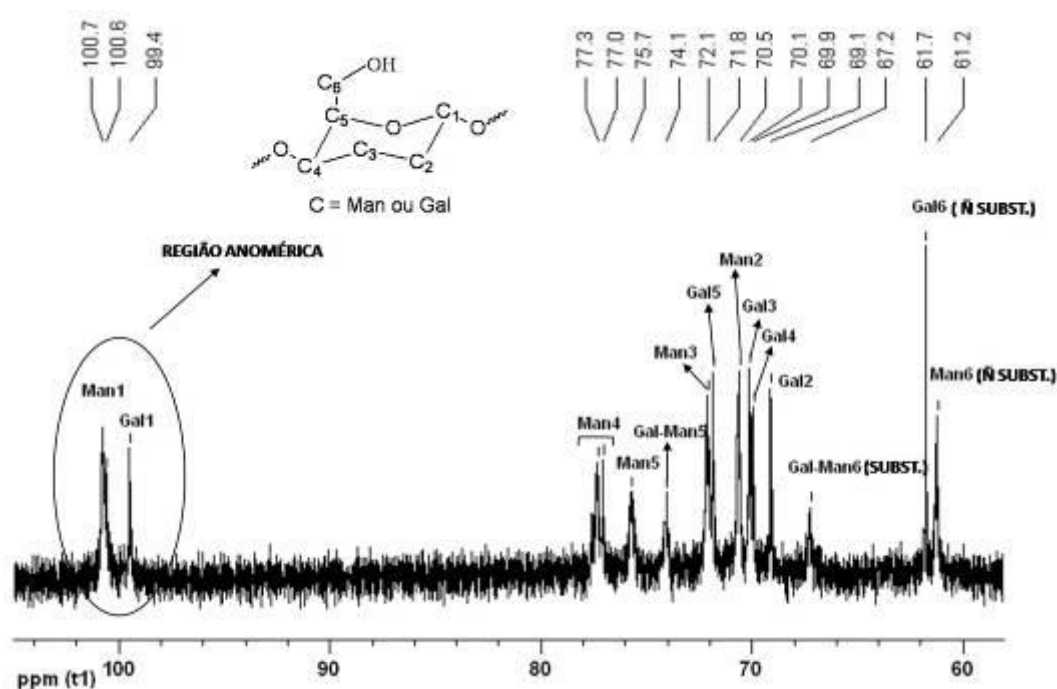


FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN DO CARBONO TREZE (^{13}C) COM AS ATRIBUIÇÕES PARA OS CARBONOS DAS UNIDADES DE β -D-MANOPIRANOSE (MAN) E α -D-GALACTOPIRANOSE (GAL) DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea* (AMOSTRA GMPFP). ANÁLISE EM 100 MHz DE FREQUÊNCIA, EM D_2O , A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ)

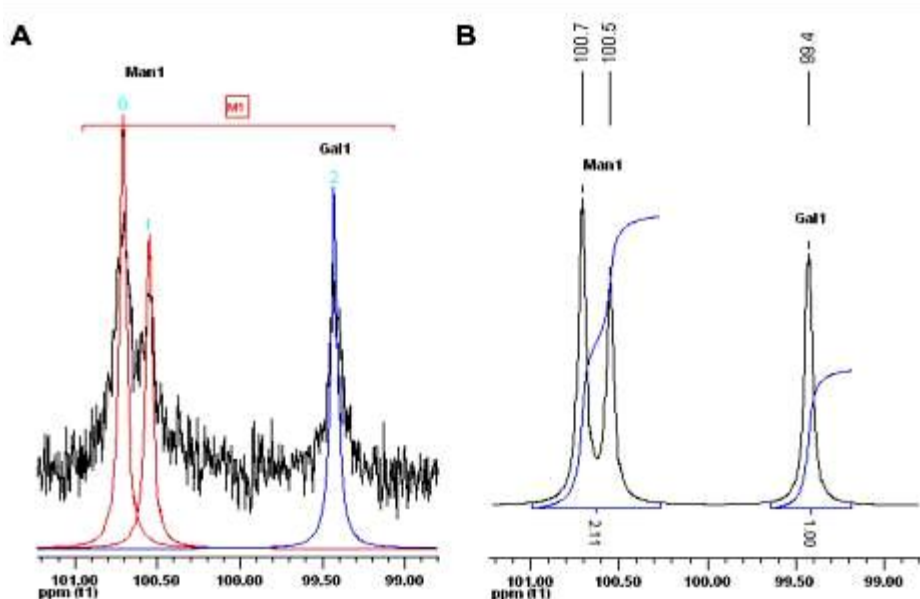


FIGURA 29 – DECONVOLUÇÃO E GERAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN (B) DO CARBONO TREZE (^{13}C) NA REGIÃO DO CARBONO ANOMÉRICO (β -D-MANOPIRANOSE – MAN1 E α -D-GALACTOPIRANOSE – GAL1) DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea* (AMOSTRA GMPFP) EM SOFTWARE MESTREC. A INTEGRAÇÃO FORNECEU A RAZÃO MAN/GAL (2,1). ANÁLISE EM 100 MHz DE FREQUÊNCIA, EM D_2O , A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ)

O espectro gerado após a deconvolução mostrou três deslocamentos bem resolvidos: um em δ 101,7, referente ao C-1 da manose não substituída, outro em δ 100,5 do C-1 da manose substituída e outro em δ 99,4, referente ao C-1 da galactose. A integração nessa região mostrou uma razão Man/Gal de 2,1, similar ao resultado obtido pelo espectro de ^1H -RMN.

A distribuição das unidades de galactose ao longo da cadeia de manose foi estudada de acordo com o trabalho de DEA e MORRISON (1975), analisando as díades formadas na região de δ 77 e δ 78 do ^{13}C -RMN, atribuídas aos C-4 das unidades da manose ligadas ou não as unidades galactose. As três possibilidades estão destacadas no espectro da amostra GMPFP gerado pela deconvolução (FIGURA 30 B) da região de C-4 do espectro de RMN do carbono treze. De acordo com os autores acima, na região de C-4 o pico I refere-se ao deslocamento em δ 77,5, o pico II em δ 77,3 e o pico III em δ 77. Integrando a área dos sinais em C-4, foi possível obter um valor em percentual (soma das três áreas) e a intensidade (%) de cada pico indicou as probabilidades de distribuição ao longo da cadeia do polímero.

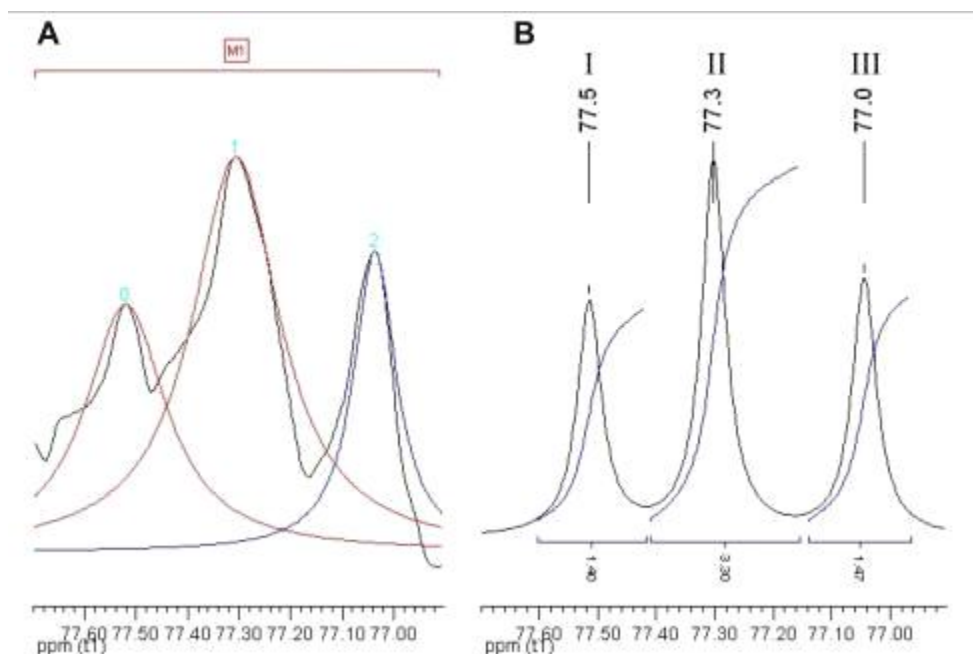


FIGURA 30 – DECONVOLUÇÃO (A) E GERAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DO CARBONO TREZE (^{13}C) NA REGIÃO DO C-4 DA CADEIA DA β -D-MANOPIRANOSE (B) DA AMOSTRA GMPPF. OS SÍMBOLOS EM ROMANO INDICAM O GRUPO DE DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM DEA E MORRISON (1975). ANÁLISE EM 100 MHz DE FREQUÊNCIA, EM D_2O , A 70°C . DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ)

Os três picos referentes ao C-4 no espectro de ^{13}C -RMN mostraram uma maior probabilidade de regiões tipo II (54%), considerada regular, seguida do tipo III (24%) considerada com arranjo em blocos e a do tipo I (22%) com arranjo irregular. Pelo valor da integração dos picos obteve-se uma razão Man/Gal de 2,4, próxima dos valores obtidos pelo espectro de hidrogênio e do carbono treze (2,1).

A FIGURA 31 mostra um esquema de como seria a estrutura da galactomanana de *C.ferrea* var. *ferrea* de acordo com os resultados da distribuição da galactose na cadeia de manose. Esses resultados mostraram que a galactomanana da *C.ferrea* var. *ferrea*, possui uma estrutura com substituição aleatória, próxima da goma comercial de Guar e de Locusta (GRASDALEN e PAINTER, 1980).

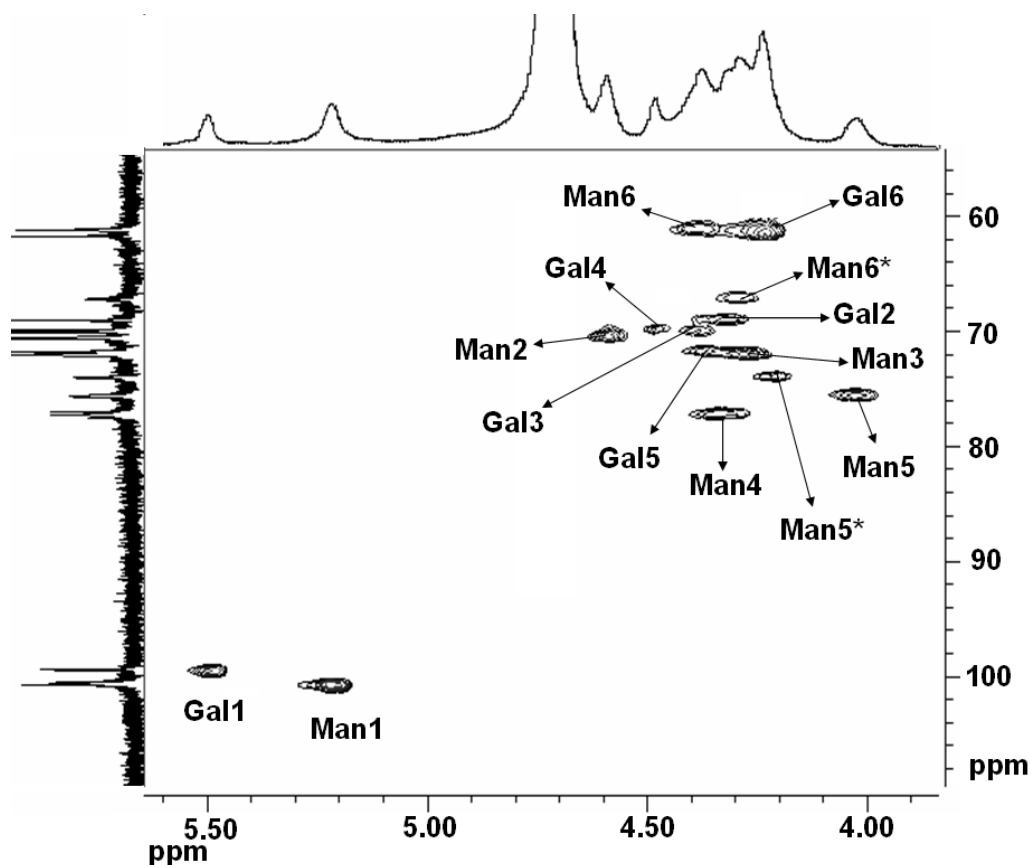


FIGURA 32 – ESPECTRO BIDIMENSIONAL HMQC (C-H) RESOLVIDO PARA A GALACTOMANANA DA *C. ferrea* var. *ferrea* (GMPFP). EM D₂O, A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ). * = MAN5* E MAN6* DAS UNIDADES SUBSTITUÍDAS

Para confirmar os valores atribuídos pelo HMQC, foi realizada outra análise bidimensional de RMN com correlação homonuclear para o hidrogênio (COSY). Os resultados da correlação H-H (COSY) encontram-se na FIGURA 33. Os deslocamentos do hidrogênio no HMQC foram assumidos na análise do COSY, verificando se há conectividades correspondentes entre os hidrogênios vizinhos, confirmando, assim, a estrutura da galactomanana de *C. ferrea* var. *ferrea*.

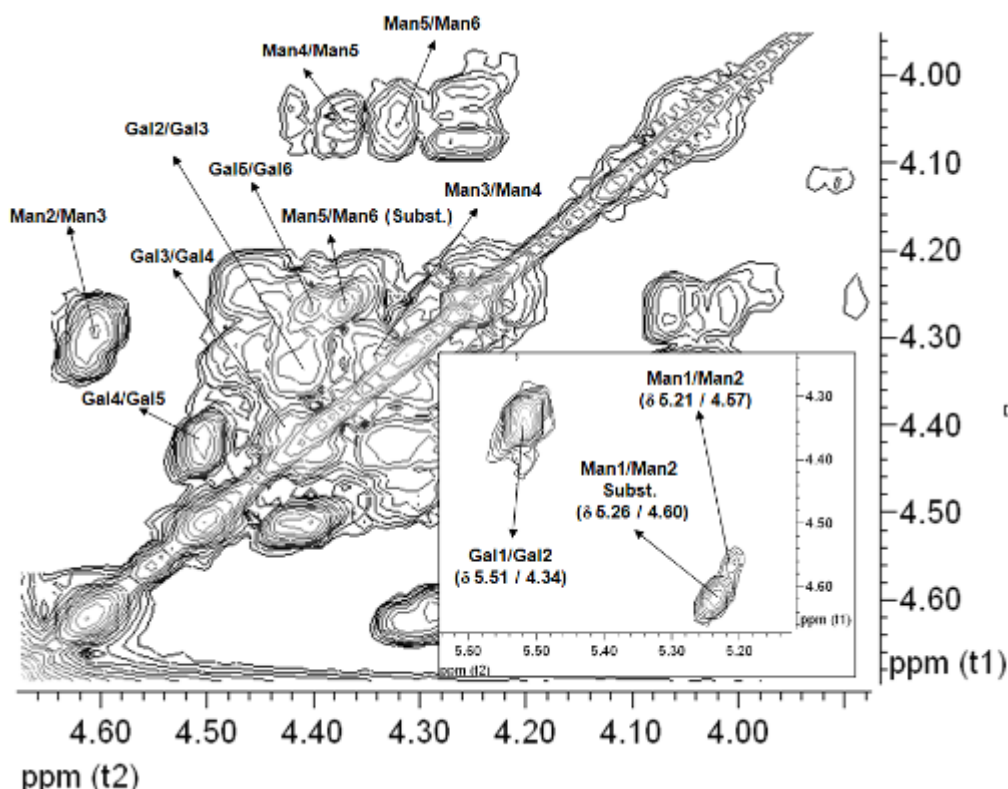


FIGURA 33 – ESPECTRO BIDIMENSIONAL DA CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR DO HIDROGÊNIO (COSY) DA GALACTOMANANA DA *C. ferrea* var. *ferrea* (amostra GMPFP); GAL – PARA OS HIDROGÊNIOS DA α -D-GALACTOPIRANOSE E MAN – PARA OS HIDROGÊNIOS DA β -D-MANOPIRANOSE, EM D₂O, A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ)

As análises bidimensionais comprovaram a estrutura da GMPFP em relação às atribuições adotadas e os valores obtidos de acordo com a TABELA 5. Quanto à distribuição (aleatória) e a relação Man/Gal (2,1:1), pela construção de espectros de RMN do carbono treze e hidrogênio na deconvolução dos picos, esses forneceram dados comparáveis com as técnicas cromatográficas, que indicaram um polissacarídeo altamente substituído como a galactomanana de Guar comercial.

5.5.2 Análise dos polissacarídeos modificados via oxidação (GMPFOXT) e N-alquilação/oxidação (GMPFOXD) da galactomanana de Pau-ferro (GMPF) por ressonância magnética nuclear do carbono treze

Para verificar a modificação específica com o reagente TEMPO, vários autores utilizam a técnica de RMN do carbono treze para observar a formação do grupo carboxil na estrutura do polissacarídeo, além de outras sínteses que geram grupos funcionais específicos que podem ser facilmente identificados por ^{13}C -RMN (DE NOOY e BESEMER, 1995; FRASCHINI *et al.*, 2000; FOLLAIN *et al.*, 2008) .

O aspecto dos espectros de ^{13}C -RMN obtidos para a caracterização dos derivados apresentou baixa resolução devido à utilização de tubos de 10 mm, porém foi possível observar, de forma qualitativa, os grupos funcionais gerados no processo de modificação química. O espectro do derivado oxidado, GMPFOXT (FIGURA 34-B), mostrou regiões características relacionadas à formação do carboxilado gerado na síntese conforme indicado pelos autores acima, sendo observado em campo baixo à δ 175,0 (FIGURA 34-C).

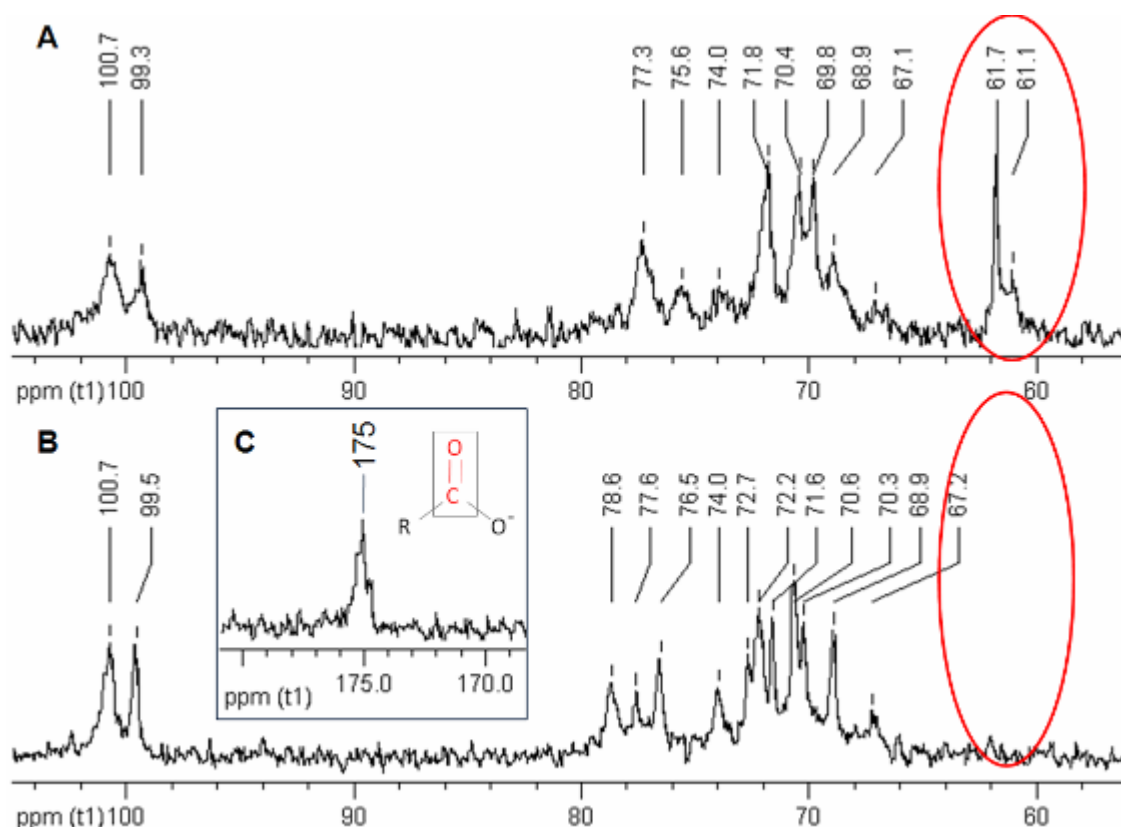


FIGURA 34 – ^{13}C -RMN DA GALACTOMANANA DE *C.ferrea* var. *ferrea* BRUTA (GMPF, A), DO DERIVADO OXIDADO (GMPFOXT, B) E SINAL DA CARBONILA GERADA NA SÍNTESE COM REAGENTE TEMPO (C) EM SISTEMA $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ À 30°C, UTILIZANDO ACETONA COMO PADRÃO INTERNO, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM ppm (δ)

A seletividade do reagente TEMPO foi observada pelo desaparecimento dos sinais dos C-6 livres da galactomanana bruta (Man6 e Gal6) verificado pelos sinais em δ 61,7 e 61,1 da GMPF (FIGURA 34-A). A região dos carbonos das unidades monossacarídicas também sofreu mudanças, com deslocamentos dos sinais para campo mais baixo, principalmente o C-5 da Man devido à presença do átomo de oxigênio mais eletronegativo da carbonila gerada na síntese.

Na segunda síntese efetuada com o reagente TEMPO, com a inclusão da dodecilamina por um processo de N-alkilação e posterior oxidação, também se obteve um espectro de RMN do carbono treze que se encontra na FIGURA 35.

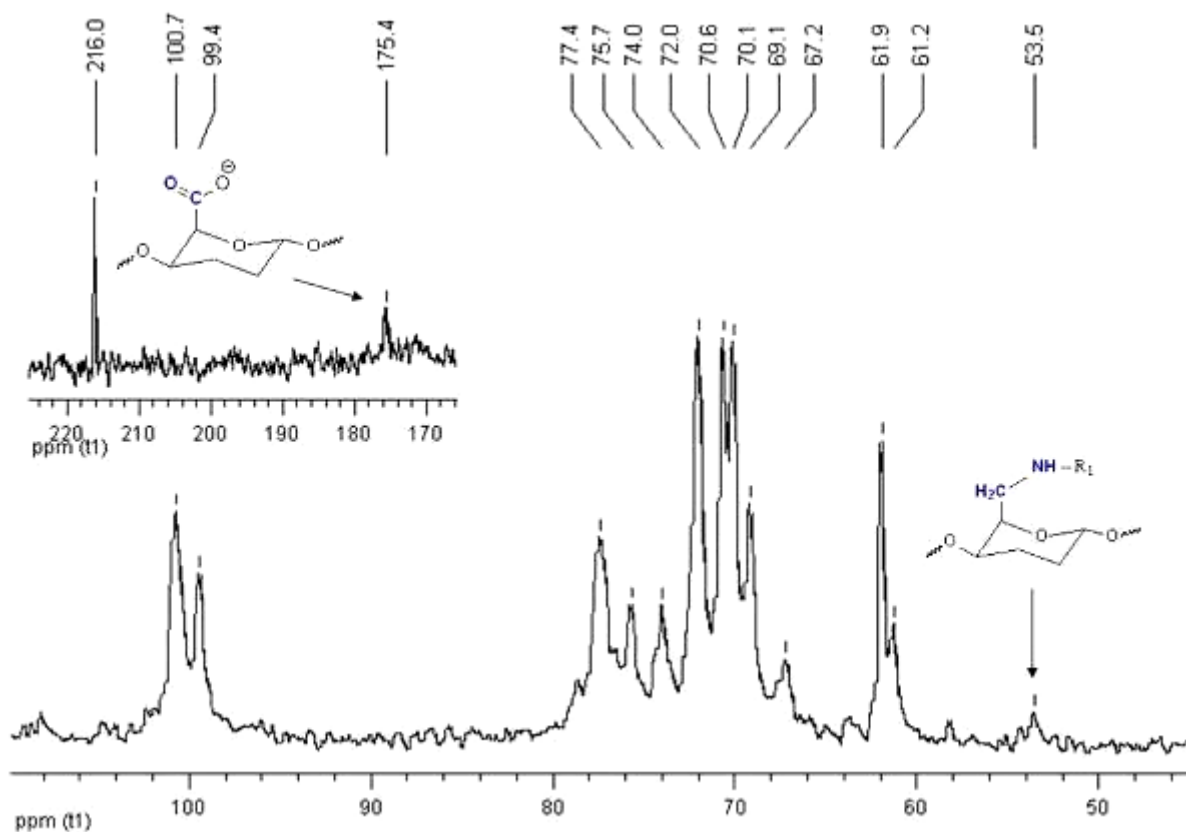


FIGURA 35 – ^{13}C -RMN DO DERIVADO N-ALQUILADO/OXIDADO DA GALACTOMANANA *C.ferrea* var. *ferrea* (GMPFOX) EM SISTEMA $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ À 30°C , UTILIZANDO ACETONA COMO PADRÃO INTERNO, DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM ppm (δ). AS UNIDADES EM AZUL INDICAM A QUAL CARBONO É ATRIBUÍDO O SINAL

Pelo espectro, verificou-se que os carbonos pertencentes à unidade monossacarídica mantiveram os deslocamentos químicos correspondentes, apenas em C-5 com um pequeno sinal aparecendo entre δ 77,4 e 75,7, devido à presença

do grupo carboxil gerado na oxidação, conforme determinado para o GPFOXT. Porém, observam-se dois deslocamentos que indicam o processo de N-alquilação/oxidação, um em δ 53,5, tendo como produto final uma amina secundária, e outro deslocamento em δ 175,4, que indica a formação do grupo carboxil proveniente da oxidação. A diminuição dos sinais dos C-6 livres da GMPF (δ 61,9 e 61,2) em relação aos outros, assim como na síntese da GMPFOXT, mostraram a especificidade do reagente TEMPO.

A atribuição do deslocamento em δ 53,5 para o carbono ligado ao nitrogênio foi relacionada às obtidas por ORSATO (2007) no processo de síntese por N-alquilação a partir de haletos de alquila, obtendo aminas primárias e secundárias. Podemos afirmar que se trata de amina secundária, pois no trabalho de FOLLAIN *et al.* (2008) no estudo da formação de aminas e amidas, os autores atribuíram deslocamentos em δ 40,5 e 170,3, respectivamente à aminas primárias e amidas, deslocamentos que não foram observados no resultado para GMPFOXD, o que indica que a síntese para o derivado N-alquilado/oxidado segue o mecanismo proposto na FIGURA 9 (pag. 36).

5.6 CARACTERIZAÇÃO DA GALACTOMANANA DE *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* (GMPF) E DOS SEUS DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD) POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

De acordo com as estruturas propostas para a galactomanana de *C. ferrea* var. *ferrea* (amostra GMPF) e para os derivados resultantes da oxidação (amostra GMPFOXT) e da N-alquilação/oxidação (amostra GMPFOXD), existem ligações ao longo da cadeia dos polissacarídeos que podem ser observadas, de forma qualitativa, por espectroscopia na região do infravermelho, pois indicam possíveis estiramentos e deformações que possibilitam diferenciar as estruturas de cada polissacarídeo analisado. Essas ligações estão apresentadas no QUADRO 2.

Tipo de ligação	Origem
O – H	Hidroxilas associadas presentes ao longo da cadeia polimérica da GMPF, GMPFOXT e GMPFOXD
C – H (1)	Nas unidades monossacarídicas ($-\text{CH}$, $-\text{CH}_2-$)
C – H (2)	Carbono secundário presente na cadeia da dodecilamina ligada na GMPFOXD ($-\text{CH}_2-$)
C – H (3)	Carbono primário presente na cadeia da dodecilamina ligada na GMPFOXD ($-\text{CH}_3$)
C – O	Nas unidades monossacarídicas ($-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$)
C = O	Do ácido carboxílico gerado na oxidação (GMPFOXT e GMPFOXD)
C – N e N – H	Da amina secundária gerada N-alquilação/oxidação (GMPFOXD)

QUADRO 2 – TIPOS DE LIGAÇÕES PRESENTES NAS ESTRUTURAS DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea* (GMPF) E DE SEUS DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD)

Avaliando os espectros obtidos na região do infravermelho entre 4000-400 cm^{-1} da galactomanana nativa (GMPF) e dos seus respectivos derivados (GMPFOXT e GMPFOXD), verificaram-se bandas características para cada amostra, indicando que há diferença estrutural entre elas (FIGURA 36 e FIGURA 37).

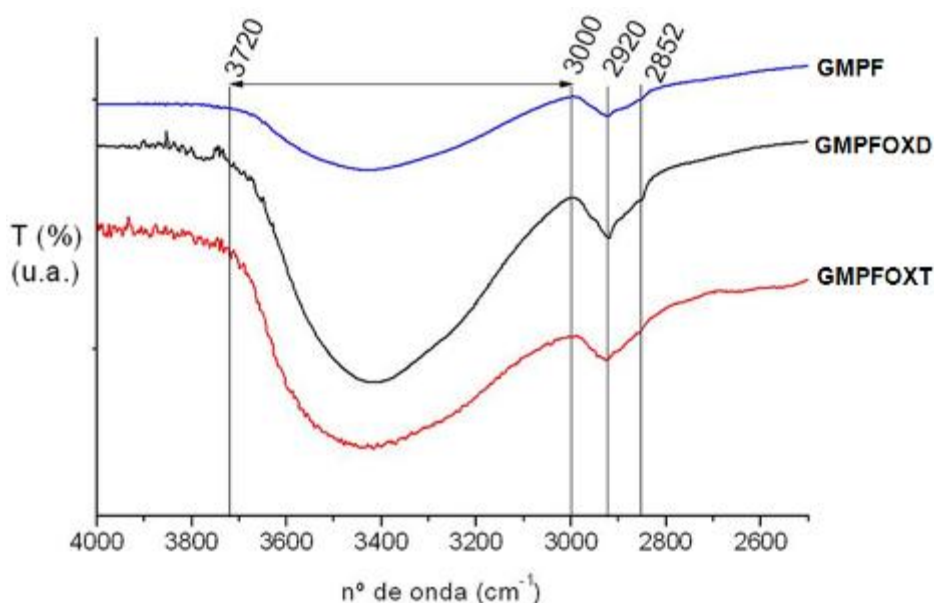


FIGURA 36 – ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (2600-4000 cm^{-1}) DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea* (GMPF) E DE SEUS DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD). (u.a.) = UNIDADE ARBITRÁRIA

Na FIGURA 36, estão destacadas três bandas: a primeira entre 3000 e 3720 cm^{-1} característica de deformação axial do O–H, correspondente à ligação de hidrogênio intermolecular e intramolecular, com um alargamento e aumento na intensidade. Esse aumento nas bandas de O–H foi maior nos derivados GMPFOXT e GMPFOXD, e pode estar associado à mudança do arranjo espacial e, conseqüentemente, um favorecimento na associação das hidroxilas presentes na estrutura dos polímeros. As bandas em 2920 e 2852 cm^{-1} , foram atribuídas às deformações axiais da ligação C–H para carbonos 2^{os} (–CH₂–) e 1^{os} (–CH₃), respectivamente. No caso da terceira banda, essa apareceu apenas no derivado GMPFOXD, e pode estar relacionada com a presença da metila da cadeia alifática da dodecilamina presente na estrutura do polissacarídeo N-alquilado.

Analisando a outra região do espectro na região do infravermelho (750-1850 cm^{-1}) das amostras GMPF, GMPFOXT e GMPFOXD (FIGURA 37), verificaram-se algumas bandas complementares (com outras deformações) das ligações observadas em números de onda acima de 2600 cm^{-1} . Entre 1385 e 1494 cm^{-1} , nas três amostras se observou uma banda larga que foi atribuída às deformações angulares da ligação C–H dos carbonos 1^{os} e 2^{os}.

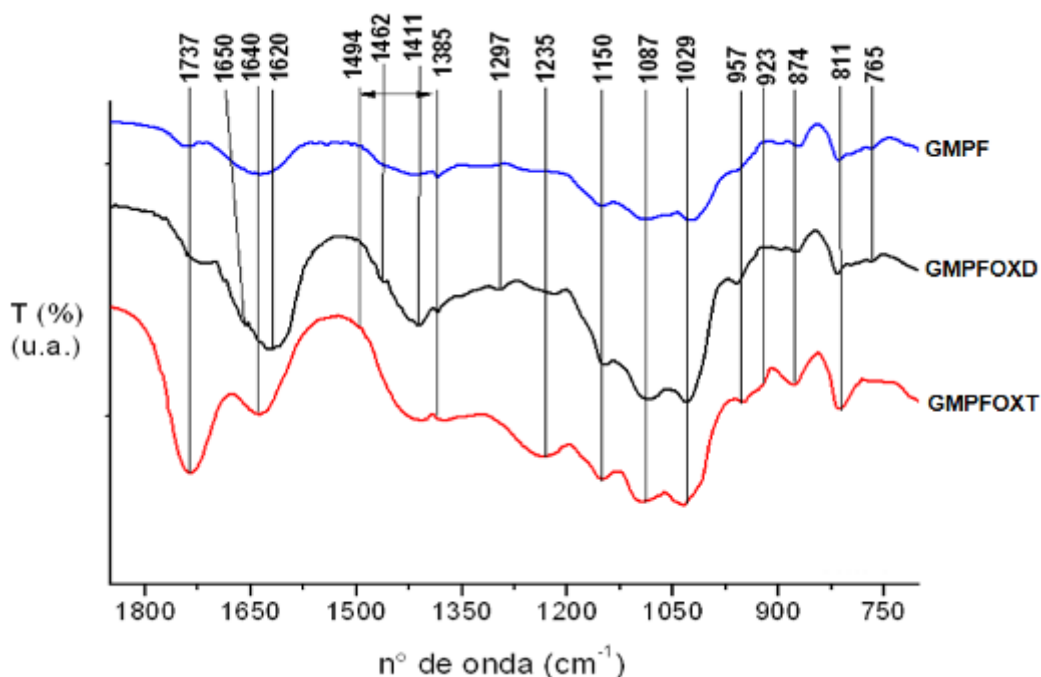


FIGURA 37 – ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (700-1850 cm^{-1}) DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea* (GMPF) E DE SEUS DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD). (u.a.) = UNIDADE ARBITRÁRIA

Uma banda de intensidade fraca em 765 cm^{-1} também confirmou a presença de carbonos 2^{os} na estrutura da GMPF e de GMPFOXD em maior quantidade em relação a GMPFOXT. Em 1029 cm^{-1} se observou a deformação angular da ligação C–O de alcoóis, comum na estrutura das três amostras.

Nos derivados foram observadas as deformações características que ocorreram após a reação de oxidação e N-alquilação. A GMPFOXT apresentou uma banda intensa em 1735 cm^{-1} , referente à carbonila (C = O) do ácido carboxílico em seu estado protonado e outra em 1640 cm^{-1} em seu estado carboxilado ($-\text{COO}^-$). O derivado N-alquilado/oxidado GMPFOXD há um estiramento em 1650 cm^{-1} correspondente a deformação angular simétrica da ligação C–N, e outra em 1620 cm^{-1} que foi atribuída à deformação angular da ligação N–H. Em 1730 cm^{-1} observou-se uma banda correspondente a carbonila gerada na oxidação posterior a N-alquilação indicando, portanto, que hidroxilas primárias da amostra GMPFOXD foram convertidas a ácido. As bandas das regiões entre 700 a 1300 cm^{-1} foram atribuídas à estrutura interna do polissacarídeo, comum entre as amostras GMPF, GMPFOXT e GMPFOXD. As atribuições discutidas anteriormente e as da região da impressão digital das amostras GMPF, GMPFOXT e GMPFOXD encontram-se no TABELA 6.

TABELA 6 – BANDAS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR) OBSERVADAS NOS ESPECTROS DA GALACTOMANANA DE *C. ferrea* var. *ferrea* (GMPF) E SEUS DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD)

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
1735 - 1640	estiramento C = O, de grupos carboxílicos e carboxílicos
1650	deformação angular simétrica da ligação C - N
1620	deformação angular da ligação N - H
1385-1494-765	deformações angulares e axiais da ligação C–H
1411	estiramento da ligação C – N de aminas secundárias
1462	deformações angulares e axiais da ligação C–O–H do ácido
1297	estiramento da ligação O–H primários e dos grupos carboxílicos
923-874	deformações de C–H da unidade monossacarídica
1150-1087-1029-957-874-811	estiramento C–O de alcoóis de carboidratos,

Pelos resultados obtidos pela espectroscopia na região do infravermelho foi possível identificar qualitativamente os derivados GMPFOXT e GMPFOXD em relação à GMPF, mostrando que as reações de derivatização da galactomanana de *C.ferrea* var. *ferrea*, a princípio, foram efetuadas.

5.7 ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS POR CROMATOGRAFIA DE PERMEÇÃO EM GEL (GPC) – DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLARES (M_n , M_w), TAMANHO MOLECULAR (R_h E R_g), VISCOSIDADE INTRINSECA ($[\eta]$) E HOMOGENEIDADE

Primeiramente, as amostras (GG, GMPF, GMPFOXT e GMPFOXD) foram analisadas quanto à homogeneidade e seu grau de polidispersão (M_w/M_n) através dos detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz laser (RALLS e LALLS). Os perfis de eluição encontram-se na FIGURA 38.

Analisando os cromatogramas, os volumes de retenção para os polissacarídeos foram os mesmos (em 15 mL), e somente o derivado N-alquilado/oxidado saiu em 16 mL, o que pode ser atribuído ao seu caráter hidrofílico, indicando a influência da modificação química sobre o comportamento em solução. Avaliando a intensidade dos picos de índice de refração (RI), verificou-se que todas as amostras analisadas por GPC apresentaram baixo sinal de aquisição, indicando baixa concentração do polímero, onde a filtração tendeu a reter grande quantidade do polímero durante o processo.

Calculou-se, através dos perfis cromatográficos, também a massa molar ponderal média (M_w), baseada na fração em massa das moléculas de determinada massa molecular, e a numérica média (M_n), baseada no número de moléculas, a viscosidade intrínseca (VI), os raios de giração (R_g) e hidrodinâmico (R_h) e a constante de Mark-Houwink (α). Esses parâmetros foram obtidos utilizando o incremento do índice de refração (dn/dc) dos polímeros calculado previamente, sendo o dn/dc para goma Guar de 0,143 e para a galactomanana do Pau-ferro de 0,146.

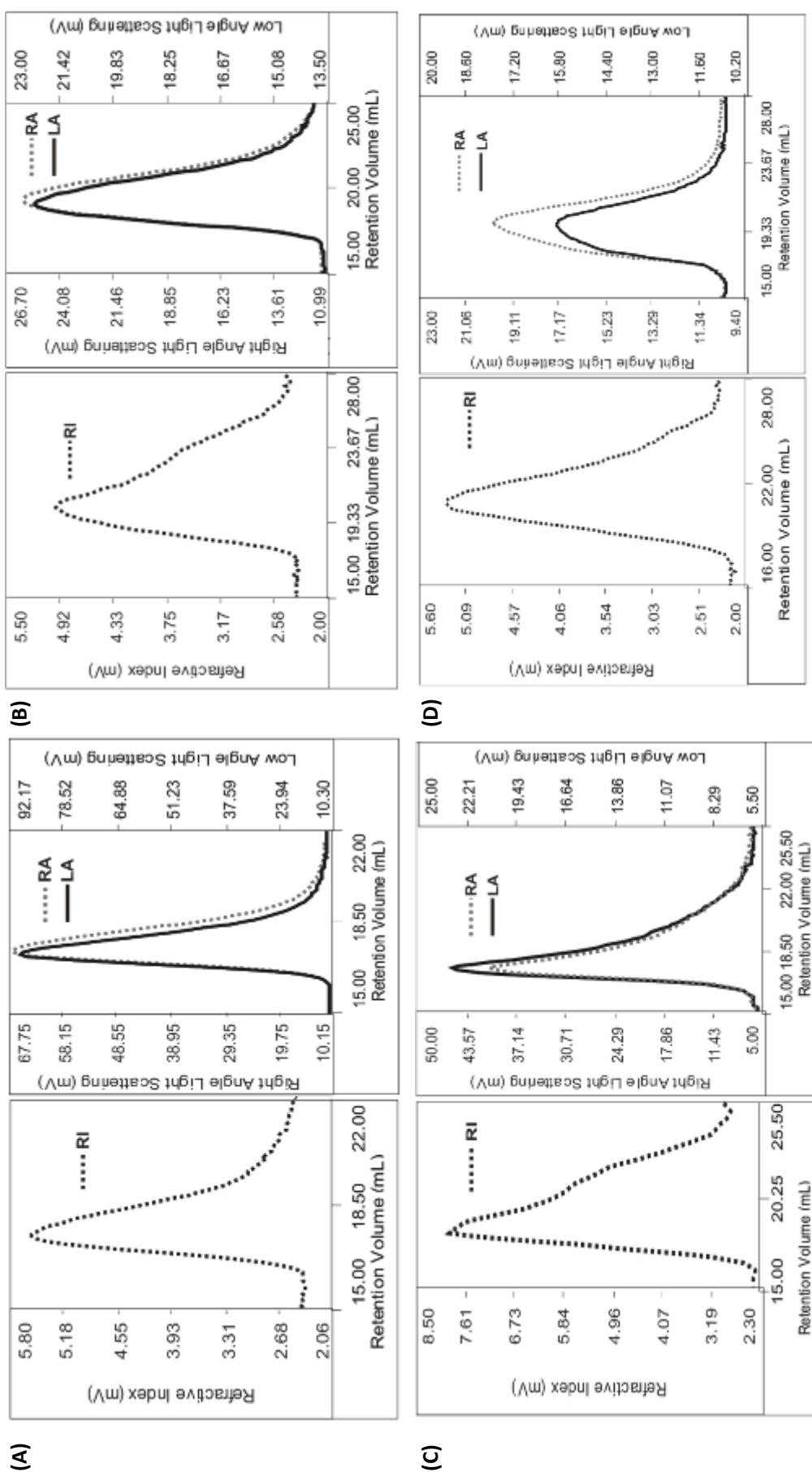


FIGURA 38 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE PERMEÇÃO EM GEL (GPC) DAS GALACTOMANANAS DE GUAR (A), DE PAU-FERRO (B), E DERIVADOS OXIDADO (C) E N-ALQUILADO/OXIDADO (D) COM TRIDETECTORES: SENDO (RI) – ÍNDICE DE REFRAÇÃO, ESPALHAMENTO DE LUZ EM (RA) ÂNGULO RETO E (LA) – EM ÂNGULO BAIXO (7°).

Os cálculos foram realizados no *software* (OmniSEC) que acompanha o equipamento e estão na TABELA 7, onde são mostrados os valores de massa molar ponderal média (M_w); massa molar numérica média (M_n); grau de polidispersão (M_w/M_n); raio de giro (R_g); raio hidrodinâmico (R_h); viscosidade intrínseca ($[\eta]$) determinada pelo detector viscosimétrico acoplado ao sistema cromatográfico e a constante de Mark-Houwink (α).

TABELA 7 - VALORES DE MASSA MOLAR (M_w E M_n), POLIDISPERSÃO (M_w/M_n), RAO DE GIRO (R_g), RAO HIDRODINAMICO R_h , VISCOSIDADE INTRÍNSECA ($[\eta]$) E CONSTANTE α DE MARK-HOUWINK PARA AS AMOSTRAS DE GALACTOMANANA DE *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* (GMPF), *Cyamopsis tetragonolobus* (GG) E DERIVADOS OXIDADO (GMPFOXT) E N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD)⁽¹⁾

Amostra	GG	GMPF	GMPFOXT	GMPFOXD
M_w (g/mol)	$1,66 \times 10^6 (\pm 0,057)$	$8,99 \times 10^5 (\pm 0,61)$	$2,25 \times 10^5 (\pm 0,065)$	$2,35 \times 10^5 (\pm 0,11)$
M_n (g/mol)	$1,18 \times 10^6 (\pm 0,12)$	$6,25 \times 10^5 (\pm 0,091)$	$1,44 \times 10^5 (\pm 0,023)$	$1,13 \times 10^5 (\pm 0,10)$
M_w/M_n	$1,42 (\pm 0,11)$	$1,44 (\pm 0,11)$	$1,56 (\pm 0,049)$	$2,17 (\pm 0,098)$
$[\eta]$ (dL/g)	$11,9 (\pm 0,53)$	$10,51 (\pm 0,53)$	$1,85 (\pm 0,08)$	$2,74 (\pm 0,11)$
R_h (nm)	$66,1 (\pm 2,04)$	$47,5 (\pm 5,16)$	$14,10 (\pm 3,01)$	$19,6 (\pm 0,87)$
R_g (nm)	$95,7 (\pm 4,2)$	$74,3 (\pm 0,7)$	$52,10 (\pm 0,35)$	$32,8 (\pm 5,14)$
α	$0,68 (\pm 0,023)$	$0,63 (\pm 0,015)$	$0,62 (\pm 0,10)$	$0,78 (\pm 0,06)$

⁽¹⁾ - por GPC Viscotek 270 Dual Detector, colunas PWxl 2500, 4000 e 6000, a 30 °C

Os valores de M_w obtidos por GPC foram determinados por uma relação entre a integração dos picos do índice de refração (RI) e o espalhamento de luz em ângulo baixo (LALLS), sendo este método adotado para a determinação da massa absoluta para moléculas grandes. Os resultados mostram uma galactomanana de Guar com M_w ($1,66 \times 10^6$ g/mol) maior que a da GMPF ($8,99 \times 10^5$ g/mol), o que pode ser observado pelo abaixamento no valor da viscosidade intrínseca para a GMPF o qual é dependente do M_w do polímero. Para os derivados da reação da oxidação seletiva e adição de grupo funcional aminoalquilado houve uma diminuição do valor de M_w e $[\eta]$, o qual pode ser explicado devido o alto pH do meio reacional e ao produto formado no meio, onde pode ocorrer a β -eliminação (ASPINALL, 1982; SIERAKOWSKI, 1988; YUN YANG e MONTGOMERY., 2001). A redução da massa molar durante a oxidação foi, também, observada por MARTIN (2003) e FREITAS *et*

al. (2004) para xiloglucana de *H. coubaril*, pululana (NOOY *et al.*, 1996) e *Anacardian occidentale* (CUNHA *et al.*, 2007).

Os valores de M_w e $[\eta]$ para a GG e GMPF analisados no presente trabalho, foram próximos dos encontrados na literatura. Valores de massa molar e de viscosidade intrínseca para galactomananas de leguminosas foram obtidos na faixa de $7,00 \times 10^5$ a $3,05 \times 10^6$ g/mol, e 10 dL/g a 14 dL/g, respectivamente (BEER *et al.*, 1999; AZERO e ANDRADE, 2002; CUNHA *et al.*, 2007), sendo a variação de massa resultante da fonte e do processo de extração do polissacarídeo.

Pelas medidas por espalhamento de luz (LALLS e RALLS) são obtidos os valores de raio de giração (R_g) das galactomananas. O raio de giração é considerado como a medida da distância das pontas da cadeia do polímero, ao contrário do raio ou volume hidrodinâmico (R_h) que considera a cadeia polimérica como uma esfera (AZERO e ANDRADE, 2002). Pelos resultados de R_g , observou-se uma relação com os de M_w , onde conforme aumentaram os valores de massa, também aumentaram os de R_g . Os resultados para o R_h podem estar relacionados com as interações intermoleculares e com o grau de substituição, conforme proposto por AZERO e ANDRADE (2002). Possuindo uma substituição aleatória, como é o caso da galactomananas estudadas, tendem a formar uma conformação mais alongada, aumentando o valor de R_h , conforme observado para os obtidos para a GG (66,1) e GMPF (47,5). Para os derivados observou-se um aumento no valor R_h para GMPFOX (19,6) em relação à GMPFOXT (14,1), indicando que a alquilação favoreceu uma conformação mais alongada do polímero.

Os valores da constante de Mark-Houwink (α) forneceram informações a respeito da estrutura do polímero num determinado solvente. Em geral, se α estiver entre 0-0,5 considera-se a molécula uma esfera, valores entre 0,5-0,8 foram encontrados para conformações de cadeias flexíveis de conformação ao acaso (*random coil*), enquanto que 0,8-1,0 para moléculas rígidas em forma de bastão ou alongadas (MOREIRA *et al.*, 2004; HARDING, 2005). Todas as galactomananas analisadas apresentaram valores entre 0,5 e 0,8 (TABELA 7), portanto, uma conformação ao acaso foi atribuída aos polímeros do presente trabalho.

5.8. DETERMINAÇÃO POR FLUORESCÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE AGREGAÇÃO CRÍTICA (CAC) DA GALACTOMANANA DE *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* (GMPF), DERIVADO OXIDADO (GMPFOXT) E DERIVADO N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD)

As análises de fluorescência serviram para estudar o comportamento do pireno em sistemas contendo o derivado oxidado (GMPFOXT) e o N-alquilado/oxidado (GMPFOXD), verificando o efeito das cargas adicionadas ao polímero quando estão em solução, e comparando-as com a galactomanana de Pau-ferro (GMPF) que é neutra. Foi analisada também, para efeito de comparação, a goma Guar (GG) devido às semelhanças estruturais com a GMPF.

O sistema adotado para as análises dos polissacarídeos, uma solução de nitrato de sódio (0,1 mol/L) com azida de sódio (200 ppm), possui uma elevada polaridade, e conforme visto na FIGURA 19, observou-se uma elevada intensidade do pico I em relação ao pico III, indicando uma pequena quantidade de ambientes hidrofóbicos. Nos carboidratos, o pireno procura regiões mais hidrofóbicas da molécula e os sinais dos picos I e III variam de acordo com o grau de hidrofobicidade do meio, conforme discutido anteriormente.

Dessa forma, obteve-se a concentração de agregação crítica (CAC) através dos perfis da razão pico III e pico I (III/I) em função da concentração do polissacarídeo (mg/mL) (FIGURA 39). Através da extrapolação de duas retas sobre a tangente das curvas dos gráficos analisados obteve-se o valor da concentração de agregação crítica (CAC) para os sistemas com os polissacarídeos. Os resultados da CAC encontram-se na TABELA 8.

TABELA 8 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE AGREGAÇÃO CRÍTICA (CAC) DA GMPF, GG, DERIVADO OXIDADO (GMPFOXT) E DERIVADO N-ALQUILADO/OXIDADO (GMPFOXD)

Amostra	CAC (mg/mL)
GMPF	0,29
GG	0,30
GMPFOXT	0,78
GMPFOXD	0,69

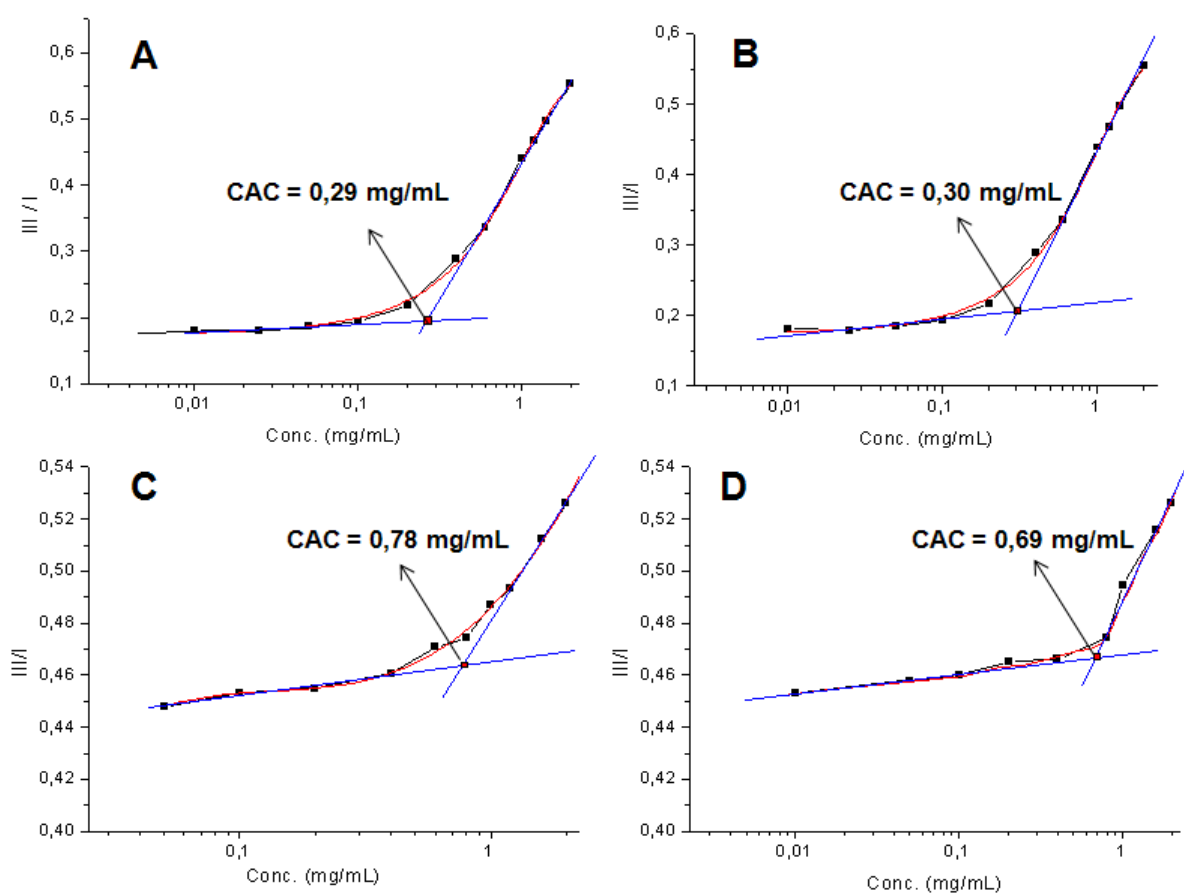


FIGURA 39 – GRÁFICO DA RAZÃO ENTRE OS PICOS III/I DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (mg/mL)

LEG.: Galactomanana de *C ferrea* var. *ferrea* – GMPF (A), GUAR – GG (B), Derivado Oxidado – GMPFOXT (C), Derivado N-Alquilado/Oxidado - GMPFOXD (D)

Considerando que a força iônica do solvente usado foi constante, a mudança no espectro de emissão do pireno foi causada pela variação da concentração dos polímeros. Analisando os gráficos da FIGURA 39, verificou-se que com o aumento da concentração dos polímeros, ocorreu também um aumento da razão III/I. Em estudos realizados por AMIJ (1995), utilizando a quitosana, o efeito da concentração do substrato sobre a emissão do pireno também foi observada. O que indicou, segundo o autor, aumento de microambientes hidrofóbicos no sistema. Pelos valores obtidos para os derivados GMPFOXT e GMPFOXD houve um indicativo de aumento de regiões hidrofóbicas ao longo da cadeia, sendo que para o derivado contendo apenas grupos carboxilados verificou-se que possui mais microambientes.

O autor acima sugeriu ainda que o aumento dos valores da razão III/I para a quitosana foi também ocasionado pelas interações hidrofóbicas intermoleculares pelas unidades contendo grupos acetil. Tal fato pode ser assumido para os derivados da galactomanana de Pau-ferro, considerando a formação de grupos carregados ao longo da cadeia do polímero que o estende e favorece essa interação intermolecular, o que justificou o aumento dos valores CAC para a GMPFOXT e GMPFOX. O derivado N-alquilado/oxidado, não mostrou efeito sobre o aumento da hidrofobicidade, e a sua CAC (0,69 mg/mL) ficou abaixo da amostra oxidada, onde se esperava um aumento no valor de CAC, devido a seu provável caráter anfifílico; todavia, sabe-se que a introdução da N-alquila teoricamente foi de apenas 7 %.

Pelos valores obtidos de CAC (TABELA 8) verificou-se que as massas molares dos polímeros também a influenciaram. Considerando que os derivados possuem menor massa molar, houve a necessidade de uma quantidade muito maior de cadeias poliméricas para atingir um estado de agregação (CAC) do que a GMPF de massa molar bem maior. Em relação aos dois materiais neutros (GG e GMPF) os valores obtidos indicaram que a similaridade estrutural e o comportamento em solução foram próximos para as duas galactomananas.

Os resultados obtidos pela técnica de fluorescência podem auxiliar em trabalhos futuros relacionados com o desenvolvimento de sistemas de encapsulamento em baixas concentrações, indicando as possíveis condições e controle de liberação de um determinado substrato.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo extrair e caracterizar um polissacarídeo proveniente do endosperma das sementes da *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*. Através de extração aquosa, os rendimentos indicaram que essa nova fonte pode ser explorada para a obtenção de polissacarídeo, mostrando boa estabilidade térmica e teores de proteínas e cinzas aceitáveis, comparados com uma fonte comercial, a goma guar (GG), e dados da literatura.

Através da composição monossacarídica e análise estrutural foi possível identificar o polissacarídeo como uma galactomanana (GM) comparável a goma guar, possuindo substituições na cadeia principal da β -D-manopiranosose em 1 \rightarrow 6 por unidades de α -D-galactopiranosose com uma distribuição aleatória, a qual foi confirmada pela ressonância magnética nuclear do carbono e do hidrogênio mono e bidimensional.

Pelas reações de modificação química utilizando o reagente N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO), dois derivados foram gerados resultando num polieletrólito (GMPFOXT) de carga negativa e outro anfifílico (GMPFOXD). As reações mostraram seletividade em relação ao ataque das hidroxilas primárias pelo aparecimento de um sinal em δ 175 referente à carbonila gerada na síntese nas análises de ^{13}C -RMN. Para a GMPFOXD a presença de um sinal em δ 53,5 referente à amina secundária, comprovou o mecanismo de reação proposto para a modificação.

Nas análises de cromatografia de permeação em gel, verificou-se que o polímero GMPF apresentou uma polidispersão moderada, com uma massa molar relativamente alta e uma conformação ao acaso. Os derivados, a GMPFOXT e GMPFOXD apresentaram diminuição em suas massas molares, indicando a presença de polímeros com diferentes estados de agregação, considerando também uma possível β -eliminação. Este efeito foi observado também na fluorescência, com o aumento dos valores de concentração de agregação crítica (CAC) dos derivados em relação à GMPF, ocasionada pelos grupos funcionais carboxil e aminoalquila incorporados na estrutura da galactomanana das sementes de Pau-ferro.

Os resultados obtidos neste trabalho poderão ser direcionados, em estudos futuros, utilizando a GMPF e seus derivados em diferentes aplicações, como em

sistemas de liberação controlada ou prolongada, como agentes encapsulantes, componente em formulação de sistemas que necessitem espessantes; ou como um agente formador de gel em sistemas de interação com outros polissacarídeos, na geração de biofilmes para deposição e avaliação de interação com vírus. Aplicações essas que têm como objetivo aumentar o interesse na exploração dessa matéria-prima de origem biológica em processos industriais e biotecnológicos, como o que hoje é efetuado com a goma Guar.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.A. Acid hydrolysis of weak linkages. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 285-287, 1965.
- AHMAD, F.B.; WILLIAMS, P.A. Effect of Galactomannans on the Thermal and Rheological Properties of Sago Starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 49, p. 1578-1586, 2001.
- AMARAL, J. **Estrutura e interação de galactomanana de *Cassia fastuosa* – xantana**. Curitiba, 1999. Dissertação (mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- AMIJI, M.M. Pyrene fluorescence study of chitosan self-association in aqueous solution, **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 211-213, 1995.
- ANDRADE, C.T.; AZERO, E.G.; LUCIANO, L.; GONÇALVES, M.P. Solution properties of the galactomannans Extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.26, p.181-185, 1999.
- ASPINALL, G. O. **The Polysaccharides**, London: Academic Press, v. 1, 340p. 1982.
- AZERO, E.G.; ANDRADE, C.T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing**, v.21, p.551-556, 2002.
- BARROS, M.A.G. Flora medicinal do Distrito Federal. **Brasil Florestal, Brasília**, v.12, n.50, p.35-45, 1982.
- BEER, M.U.; WOOD, P.J.; WEISZ, J. A simple and rapid method for evaluation of Mark-Houwink-Sakurada constants of linear random coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: application to guar galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, p. 377-380, 1999.
- BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G.D. **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. 2 ed. Florida: CRC PrAess, 279p, 1990.

BIRUEL, R.P.; PAULA, R.C.; AGUIAR, I.B. Composição química de sementes de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya* Benth.) In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 51., 2.000, Brasília. Resumos. **Brasília: Sociedade Botânica do Brasil**, p. 49, 2000.

BOBBIO, F.O. Estudo do polissacarídeo da semente de algaroba. **Revista da Associação Brasileira de Algaroba**, v.1, p. 35-59, 1987.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. **Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas**, p. 540, 1960.

BRAGD, P. L.; BESEMER, A.C.; BEKKUM, H. V. Bromide-free TEMPO-mediated oxidation of primary alcohol groups in starch and methyl α -D-glucopyranoside. **Carbohydrate Research**, v. 328, p. 355-363, 2000.

BRESOLIN, T.M.B.; SANDER, P.C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.-R; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Viscosimetric studies on xanthan and galactomannan systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p.131-138, 1997.

BUCKRIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1/2, p. 141-156, 2000.

CARVALHO, P.E.R. **Recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas – Colombo – EMBRAPA – CNPF; Brasília: EMBRAPA – SPI, p. 639, 1994

CARVALHO, R.F. **Alguns dados fenológicos de 100 espécies florestais, ornamentais e frutíferas, nativas ou introduzidas na EFLEX de Saltinho, PE**. Brasil Florestal, Rio de Janeiro, v.7, n.25, p.42-44, 1976.

CHAUBEY, M.; KAPOOR, V.P. Structure of a galactomannan from the seeds of *Cassia angustifolia* Vahl. **Carbohydrate Research**, v. 332, p. 439–444, 2001.

CHENG, Y.; BROWN, K.M.; PRUD'HOMME, R.K. Preparation and characterization of molecular weight fractions of guar galactomannans using acid and enzymatic hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p.29-35, 2002.

CHIANDOTTI, R.S. **Síntese e Propriedades de Derivados de Quitosana: Lauroil Quitosana**. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

CIUCANU, I. Per-O-methylation reaction for structural analysis of carbohydrates by mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.576, p.147–155, 2006.

CIUCANU, I.; COSTELLO, C.E. Elimination of Oxidative Degradation during the per-O-Methylation of Carbohydrates. **Journal of the American Chemical Society**, v.125, p.16213-16219, 2003.

CIUCANU, J.; KEREK, F.A. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 13, p. 209-217, 1984.

CLOSS, C.B.; CONDE-PETIT, B.; ROBERTS, I.D.; TOLSTOGUZOV, V.B.; ESCHER, F. Phase separation and rheology of aqueous starch/galactomannan systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p.67-77, 1999.

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. **Monosaccharides : their chemistry and their roles in natural products**. J. Wiley & Sons Ltda, 571p, 1995.

CUNHA, P.L.R.; VIEIRA, Í.G.P.; ARRIAGA, Â.M.C.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute, **Food Hydrocolloids**, v. 23, p.880-885, 2009.

CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA J. P. A.; Purification of guar gum for biological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p.324-331, 2007.

CUNHA, P.L.R.; RONDINELLE, R.C.; ROCHA, A.C.F.; PAULA, R.C.M; FEITOSA, J.P.A. Low viscosity hydrogel of guar gum: Preparation and physicochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 99-104, 2005.

DAAS, P.J.H.; SCHOLS, H.A.; DE JONGH, H.H. On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. **Carbohydrate Research**, v. 329, p. 609–619, 2000.

DAKIA, P. A.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. **Food Chemistry**, v. 102, p.1368-1374, 2007.

DEA, C.M.; MORRISON A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 31, p. 241–312, 1975.

DEBON, S.J.J.; TESTER, R.F. In vitro binding of calcium, iron and zinc by non-starch polysaccharides. **Food Chemistry**, v.73, p.401-410, 2001.

DIRK, L.M.A.; VAN DER KROL, A.R.; VREUGDENHIL, D.; HILHORST, H.W.M.; BEWLEY, J.D. Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 41–50, 1999.

DONG, D.C.; WINNIK, M.A. The Py scale of solvent polarities. Solvent effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and empirical correlations with E_T and Y values. **Photochemistry and Photobiology**, v. 35, p. 17-21, 1982.

DOWLING, K.C.; THOMAS, J.K. A novel micellar synthesis and photophysical characterization of water-soluble acrylamide-styrene block copolymers. **Macromolecules**, v. 23, p. 1059–1064, 1990.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analalytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUCKE, A. **As leguminosas de Pernambuco e Paraíba**. Memória do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.51, p.417-461, 1953.

EDWARD, J.T. Stability of Glycosides to Acid Hydrolysis. **Chemistry and Industry**, p.1102-1104, 1955.

ELLIS, P.R.; WANG, Q.; RAYMENT, Y.; ROSS-MURPHY, S.B. **Handbook of dietary fiber**, p. 613–657, 2001.

FERREIRA, A.L. **Propriedades Vibracionais de Polissacarídeos Naturais**. Curitiba, 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

FIGUEIREDO, A.A.; PRICE, R.L. Pilot plant production of mesquite seed polysaccharide. Paper (poster) presented at the IFT Annual Meeting in Dallas. **Program and Abstracts**, p. 179, 1986.

FOLLAIN, N.; MONTANARI, S.; JEACOMINE, I; GAMBARELLI, S.; VIGNON, M.R. Coupling of amines with polyglucuronic acid: Evidence for amide bond formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p.333-343, 2008.

FOSTER, A.B.; OVEREND, V. G. **Chemistry & Industry**, p.566. 1955.

FRASCHINI, C.; VIGNON, M. R. Selective oxidation of primary alcohol groups of β -cyclodextrin mediated by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl radical (TEMPO). **Carbohydrate Researchs**, v. 328, p.585-589, 2000.

FREITAS, R.A. **Estrutura e interação entre galactoxiloglucanas e amidos**. Curitiba, 2003. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FREITAS, R. A.; MARTIN, S.; PAULA, R.C.; FEITOSA, J.P.A.; SIERAKOWSKI, M.-R. Effect of the oxidation level in the thermogravimetric kinetics of galactoxyloglucan from *hymenaea courbaril*. **Carbohydrate Polymers**, v. 409, p.41-47, 2004.

FROLLINI, E.; REED, W. F.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolytes from polysaccharides: selective oxidation of guar gum – a revisited reaction. **Carbohydrate Polymers**, v. 27, p.129-135, 1995.

GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Water-soluble galactomannans from seeds of *Mimosaceae spp.* **Bioresource Technology**, v. 68, p. 55-62, 1999.

GANTER, J.L.M.S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C.L.O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from brazilian seeds: characterization of the oligossacarides produced by mild acid hidrólisis. **International Journal of. Biological Macromolecules**, v. 17, p. 13-19, 1995.

GANTER, J.L.M.S.; ZAWADSKI-BAGGIO, S. F.; LEITNER, S. C. S.; SIERAKOWSKI, M.-R.; REICHER, F. Structural studies of galactomannans from brazilian seeds. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 12, p. 753-767, 1993.

GANTER, J.L.M.S.; MILAS, M.; CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F.; RINAUDO, M. Study of solution properties of galactomannan from seeds of *Mimosa scrabella*. **Carbohydrate Polymers**, v. 17, p.171, 1992.

GANTER, J.L.M.S. **Estudos dos carboidratos de sementes de *Mimosa scabrella* (Bracatinga): Análise estrutural e propriedades reológicas.** Curitiba, 1991. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GANTER, J.L.M.S. **Galactomanana de sementes de *Mimosa scabrella* (Bracatinga).** Curitiba, 1988. 135 f. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GERMANO, S. **Heparinóides produzidos por modificação química em galactomananas de sementes de *Cassia fastuosa* Willd e *Mimosa scabrella* Bethan.** Curitiba, 1996. Dissertação (mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GORIN, P.A.J.; DELGOBO, C.L.; TISCHER, C.A.; IACOMINI, M. Recent advances in structural analysis of polysaccharides present in plant gum exudates with the aid of accompanying free, reducing oligosaccharides. **Carbohydrate Structure and Biological Function**, p. 175-196, 2006.

GRASDALEN, H.; PAINTER, T. NMR studies of the composition and sequence in legume-seed galactomannans. **Carbohydrate Research**, v.81, p.59–66, 1980.

HARTREE, E.F. Determination of protein a modification as the Lowry method that gives a linear photometric response. 1972. **Analitycal Biochemistry**, v. 48, p. 422-427.

HARDING, S.E. **Analysis of Polysaccharides by Ultracentrifugation. Size, Conformation and Interactions in Solution.** In: Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use. Advances in Polymer Science. Germany: Springer-verlag Berlin Heidelberg, p. 280, 2005.

HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. **Journal of Chemical Society**, v.107, p. 8-16, 1915.

HERALD, C. T. Locust/Carob Bean Gum. In: GLICKSMAN, M. **Food Hydrocolloids.** Florida:CRC Press, vol. 3, cap. 5, p.161-170, 1986a.

JANSSON, P-E.; KENNE, L.; LIEDREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chemical Communications**, n.8, 1976.

JOSHI, H.; KAPOOR, V.P. *Cassia grandis* Linn. f. seed galactomannan: structural and crystallographical studies. **Carbohydrate Research**, v.338, p.1907–1912, 2003.

KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e gradientes de campo na composição estrutura de compostos orgânicos. **Química Nova**, v.23 , p.231-236, 2000.

KALYANASUNDARAM, K.; THOMAS, J.K. Environmental effects of vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. **Journal of American Chemical Society**, v. 99, p. 2039-2044, 1977.

KAPOOR, V.P.; TARAVEL, F. R.; JOSELAU, J-P; MILAS, M.; CHANZY, H., RINAUDO. M. *Cassia spectabilis* DC seed galactomannan: Structural, crystallographical and rheological studies. **Carbohydrate Research**, v.306, p.231–241, 1998.

KATO, Y.; MATSUO, R.; ISOGAI, A. Oxidation process of water-soluble starch in TEMPO-mediated system. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p.69-75, 2003.

KAUR, L.; SINGH, H.J.; McCARTHY, O.J. Starch–cassia gum interactions: A microstructure – Rheology study, **Food Chemistry**, v. 111, p.1-10, 2008.

KIZIL, R.; IRUDAYARAJ, J.; SEETHARAMAN K. Characterization of Irradiated Starches by Using FT-Raman and FTIR Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3912-3918, 2002.

KOOP, H.S.; PRAES, C.E O.; REICHER, F.; PETKOWICZ, C.L.O; SILVEIRA, J.L.M. Rheological behavior of gel of xanthan with seed galactomannan: Effect of hydroalcoholic–ascorbic acid. **Materials Science and Engineering: C** (2008), doi:10.1016/j.msec.2008.10.004

KUHN, R.; TRISCHMANN,H.; LÖW, I. Zur Permethylierung von Zuckern und Glykosiden. **Angewandte Chemie**, v.67, p. 32, 1955.

KUNJI, E. R. S.; HARDING, M.; BUTLER, P. J. G.; ALKAMINE, P. Determination of the molecular mass and dimensions of membrane proteins by size exclusion chromatography. **Methods**, v.46, p. 62-72, 2008.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p., 2006.

LEITNER, S.C.S. **Estudo de Polissacarídeos de sementes de Stryphnodendron barbatimam (barbatimão)**. Curitiba, 1991. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras – Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, v. 1, p.147, 1998.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p.265-275, 1951.

LUCYSZYN, N.; QUORIN, M.; HOMMA, M.M.; SIERAKOWSKI, M.-R. Agar/galactomanannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. **Biological Plantarium**. Praha, v. 51, p. 173-176, 2006.

LUCYSZYN, N.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.-R. Carbohydrate Research at the UFPR. **Metals Materials And Processes**, Índia, v. 17, n. 3-4, p. 173-182, 2005.

LUCYSZYN, N. **Aplicação de galactomananas como substitutes parciais do agar no cultivo de tecidos vegetais**. Curitiba, 2004. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

LUCYSZYN, N.; **Galactomananas: novas fontes de biopolímeros e aplicações na indústria alimentícia**. Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MAIER, H.; ANDERSON, M.; KARL, C.; MAQNUSON, K.; WHISTLER, R.L. Guar, Locust bean, Tara and Fenugreek gums. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. (Ed.). **Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives**. 3. ed. New York: Academic Press, p. 215-218, 1993.

MALI, S.; FERRERO, C.; REDIGONDA, V.; BELEIA, A.P.; GROSSMANN, M.V.E.; ZARITZKY, N.E. Influence of pH and hydrocolloids addition on yam (*Dioscorea alata*) starch pastes stability. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 36, p.475-481, 2003.

MANZI, A.E.; CEREZO, A.S.; SHOOLERY, J.N. High Resolution ^{13}C -N.M.R. Spectroscopy of Legume-seed Galactomannans. **Carbohydrate Research**, v.148, p.189–197, 1986.

MARTIN, S. **Galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*: estrutura e propriedades**. Curitiba, 2003. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) UFPR.

MAURER, K., REIFF, G. Oxidations with NO_2 . II. Oxidation of cellulose with NO_2 . **Journal fuer Makromolekulare Chemie**, v.1, p.27–34, 1943.

McCLENDON, J.H.; NOLAN, W.G.; WENZLER, H.F. The role of the endosperm in the germination of legumes: galactomannan, nitrogen, and phosphorus changes in the germination of guar (*Cyamopsis tetragonolobus*, Leguminosae), **American Journal of Botany**, v.63, p. 790–797, 1976.

McCLEARY, B.V.; MATHESON, N.K. Galactomannan utilization in germinating legume seeds, **Phytochemistry**, v. 15, p. 43–47, 1976.

MELLO, S.C.; ANTONIO, M.G. Beneficiamento mecânico de sementes de pau-ferro (*Caesalpinia leiostachya* (Benth.) Ducke. In: **CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL 6, 1988, Nova Prata. Anais. Nova Prata: Prefeitura Municipal de Nova Prata / Meridional**, v.1, p.419-425, 1988.

MERCÊ, A.L.R.; FERNANDES, E.; MANGRICH, A.S.; SIERAKOWSKI, M.-R.; SZPOGANICZ, B. Fe(III)-Galactomannan Solid and Aqueous Complexes. Potentiometric, EPR Spectroscopy and Thermal Data. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p.791-798, 2001.

MERCÊ, A. L.R.; FERNANDES, E.; MANGRICH, A.S.; SIERAKOWSKI, M.-R. Evaluation of the complexes of galactomannan of *Leucaena leucocephala* and Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} . **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 3, p.224-231, 2000.

MERCÊ, A.L.R.; LOMBARDI, S.C.; MANGRICH, A.S.; REICHER, F.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWSKI, M.-R. Equilibrium studies of galactomannan of *Cassia fastuosa* and *Leucaena leucocephala* and Cu^{2+} using potentiometry and EPR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, p. 13-20, 1998.

MEYER, D.; BECKER, R.; NEUKOM, H. Milling and separation of Prosopis pod components and their application in food products. Proceedings of the symposium Mesquite Utilization. Texas Tech University, Lubbock, Texas. NAS. **Tropical legumes: resources for the future**. National Academy of Sciences, D.C. 1982.

MEYER, D. **Processing, utilization and economics of mesquite pods as a raw material for the food industry**. PhD dissertation. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, p.125, 1984.

MOREIRA, J.C.; DILVA, I.F.; WANG, S.H.; BALOGH, D.T. Determinação das constantes K e a da equação de Mark-Houwink de poli(p-acetóxiestireno). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 2, p. 80-82, 2004.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASY, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE JR.; F. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.135-137, 2002a.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE JR.; F. Cancer chemopreventive effects of constituents of Caesalpinia ferrea and related compounds, **Cancer Letters**, v.177, p.119-124, 2002b.

NEUMANN, M.G.; SCHMITT, C.C.; IMAZAKI, E.T. A fluorescence study of the interactions between sodium alginate and surfactants **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1109–1113, 2003.

NOOY, A. E. J.; *et al.* TEMPO-mediated oxidation of pullulan and influence of ionic strength and linear charge density on dimensions of the obtained polyelectrolyte chains. **Macromolecules**, v. 29, p. 6541-6547, 1996.

NOOY, A.E.J.; BESEMER, A.C.; BEKKUM, H.V. Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. **Carbohydrate Research**, v. 269 , p. 89-98, 1995.

NOOY, A.E.J.; BESEMER, A.C.; BEKKUM, H.V. Highly selective TEMPO mediated oxidation of primary alcohol groups in polysaccharides. **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.**, v. 113, p. 165-166, 1994.

OMARSDOTTIR, S.; PETERSEN, B.O.; BARSETT, H.; SMESTAD PAULSEN, B.; DUUS, J.Ø.; OLAFSDOTTIR, E.S. Structural characterisation of a highly branched galactomannan from the lichen *Peltigera canina* by methylation analysis and NMR-spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 54-60, 2006.

ONO, L. **Atividade antiviral de Galactomananas modificadas por Oxidação e/ou sulfatação**. Curitiba, 2004. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ORSATO, A. **Síntese de alquilaminoglicosídeos sulfatados para o desenvolvimento de compostos com atividade antiviral**. Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PETKOWICZ, C.L.; SIERAKOWSKI, M.-R.; GANTER, J.M.L.S.; REICHER, F. Galactomannans and Arabinans from the seeds of Caesalpiniceae. **Phytochemistry**, v. 49, n° 3, p. 737-743, 1998.

PETKOWICZ, C.L. **Biopolímeros de semente de *Schizolobium amazonicum* (pinho cuiabano): galactomana e arabinanas**. Curitiba, 1993. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PIRES, L.; GORIN, P.A.J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.-R. An active heparinoid obtained by sulphatation of a galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 165-169, 2001.

REID, J.S.G. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Legum.), **Planta**, v. 100, p.131–142, 1971.

RIZZINI, C.T.; MATTOS FILHO, A. Espécies novas da flora brasileira. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 40, n.2, p. 231-235, 1968.

SANZ, M.L.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p.74-89, 2007.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; SOUZA, L.M.; CZELUSNIAK, P.A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC–MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v.340, p. 731-739, 2005.

SIERAKOWSKI, M.-R.; MILAS, M.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M.; Specific modifications of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 51-57, 2000.

SIERAKOWSKI, M.-R. **Aspectos estruturais da mucilagem de *Pereskia aculeata*, Mill (ora-pro-nobis)**. Curitiba, 1988. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.D.X. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 23, p. 337-341, 2003.

SILVEIRA, J.L.M. **Estudos dos Carboidratos de Sementes de *Mimosa scrabrella* (Bracatinga)**. Curitiba, 1991. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 488p, 2007.

SITTIKIYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M.P. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 339-350, 2005.

SOUZA, M.V.N. Utilização do TEMPO (N-OXIL-2,2,6,6-TETRAMETILPIPERIDINA) na oxidação de alcoóis primários e secundários. **Química Nova**, v. 27, p. 287-292, 2004.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V. P. Seeds galactomannans: an overview. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, p. 295-317, 2005.

SUDHAKAR, V.; SINGHAL, R.S.; KULKAMI, P.R. Starch-galactomannan interactions: functionality and rheological aspects, **Food Chemistry**, v. 55, p. 259-264, 1996.

SUMATHI, S.; ALOK, R.R. Release behaviour of drugs from Tamarind Seed Polysaccharide tablets. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**. v. 5, p.12-18, 2002.

THYGESEN, L.G.; LOKKE, M.M.; MICKLANDER, E.; ENGELSEN, S. B. Vibrational microspectroscopy of food. Raman vs. FT-IR. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, p.50-57, 2003.

TAVARES, G.A. **Estrutura e propriedades físico-químicas de galactomanana de sementes de *Cássia faustuosa*, Willd (*Cássia*)**. Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

UEDA, A.C. **Aplicação de Micelas Reversas na Remoção de Corantes Têxteis Catiônicos**. Florianópolis, 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina.

VALENGA, F. **Estudos de interação entre galactomanana e alginato e possíveis aplicações**. Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VANDAMME, Th.F; LENOURRY, A.; CHARRUEAU, C.; CHAUMEIL, J-C. The use of polyssacharides to target drugs on the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 219-231, 2002.

VARGAS-RECHIA, C.G. *et al.* Polysaccharides from the seeds of *Senna multijuga*. **Internation Journal of Macromolecules**, v. 17, p. 409-413, 1995.

VARMA, A. J.; KOKANE, S.P.; PATHAKB, G.; PRADHAD, S.D. Thermal behavior of galactomannan guar gum and its periodate oxidation products. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, p.111-114, 1996.

VIEIRA, I.G.P.; MENDES, F.N.P.; GALLÃO, M.I.; BRITO, E.S. NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Food Chemistry**, v. 101, p. 70-73, 2007.

XIONG, X.Y.; TAM, K.C.; GAN, L. H. Release kinetics of hydrophobic and hydrophilic model drugs from pluronic F127/poly(lactic acid) nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 73–82, 2005.

WANG, Q.; ELLIS, P.R.; ROSS-MURPHY, S.B. Dissolution kinetics of guar gum powders - II. Effects of concentration and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 75-83, 2003.

WHITE, N.S.; ERRINGTON, R.J. Fluorescence techniques for drug delivery research: theory and practice. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 17– 42, 2005.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. **Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives**. New York: Academic Press, p. 53-67, 1993.

WHISTLER, R.L.; SMART, L.C. **Polysaccharide Chem.**. New York: Academic Press, p.493, 1953.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L. (Ed.). **Methods in carbohydrate chemistry 2**. New York: Academic Press, p. 65-68, 1963a.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L. (Ed.). **Methods in carbohydrate chemistry 2**. New York: Academic Press, p. 211-215, 1963b.

YACKEL, E. A.; KENYON, W. O.; Oxidation of cellulose by nitrogen dioxide. **Journal of the American Chemical Society**, v.64, p.121–122, 1942.

YUN YANG, B.; MONTGOMERY, R. β -Elimination of glucosyluronic residues during methylation of an acidic polysaccharide from *Erwinia chrysanthemy* CU 643. **Carbohydrate Research**, v.332, p.317-323, 2001.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.

ZAWADZKI-BAGGIO, S.F. **Arabinana e Galactomanana de *Schizolobium parahybum*: estudo da biossíntese de galactomanana**. Curitiba, 1994. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ANEXO 1 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. SOUZA, C.F.; LUCYSZYN, N.; MATOS, K.F.; SIERAKOWSKI, M.-R. Galactomannan from *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds. In: **2nd French-Brazilian Meeting on Polymers FBPOL-2008**. Florianópolis, SC. Brasil.
2. SOUZA, C.F.; BLACHECHEN, L.; JÓ, T.A.; LUCYSZYN, N.; SIERAKOWSKI, M.-R. Surface tension properties of some galactomannans and xyloglucans. In: **2nd French-Brazilian Meeting on Polymers FBPOL-2008**. Florianópolis, SC. Brasil.
3. GOUVÊA, M.R.; RIBEIRO, C.; SOUZA, C.F.; MARVILA-OLIVEIRA, I.; LUCYSZYN, N.; SIERAKOWSKI, M.-R. Rheological behavior of borate complex and polysaccharides. 2008. **Materials Science Engineering C**. (Aceito para publicação)
4. SOUZA, C.F.; MARVILA-OLIVEIRA, I.; LUCYSZYN, N.; BLACHECHEN, L.; SIERAKOWSKI, M.-R. Estudo de interação de amido de cará (*Discorea alata*) e galactomanana de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*). **1º Encontro sobre estruturas auto-organizadas em soluções e interfaces AUTOORG-2008**. São Pedro, SP. Brasil.
5. SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; SIERAKOWSKI, M.-R. Structure characterization of galactomannan from *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds. 2009. **Food Hydrocolloids**. (Submetido para publicação)